

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE ET TECHNIQUES MÉDICALES
—
ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ

Utilisation du virus de la rougeole en virothérapie anti-tumorale

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie, Médecine et Santé

Spécialité : Immunologie

Présentée

et soutenue publiquement par

Nicolas BOISGERAULT

Le 13 mai 2011, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs : Philippe DESPRÈS, Directeur de Recherche, Paris
Arnaud SCHERPEREEL, PU-PH, Lille

Examineurs : Yves DELNESTE, Directeur de Recherche, Angers
Frédéric TANGY, Directeur de Recherche, Paris

Directeur de thèse : Marc GRÉGOIRE, Directeur de Recherche, Nantes

INTRODUCTION	1
I. MORT CELLULAIRE	3
1. <i>Types de morts cellulaires</i>	3
a. Apoptose	3
b. Nécrose	5
c. Autophagie.....	6
d. Autres types de morts cellulaires	7
2. <i>Induction de la mort cellulaire en thérapie anti-tumorale</i>	8
3. <i>Immunogénicité de la mort cellulaire</i>	9
a. Protéines de choc thermique – Heat Shock Proteins (HSP)	12
b. Calréticuline	14
c. High-Mobility Group Box-1 (HMGB-1)	15
d. Cristaux d'acide urique.....	17
e. Adénosine tri-phosphate (ATP)	18
f. Autres molécules immunogènes	19
II. IMMUNITE ANTI-TUMORALE	20
1. <i>Activation des cellules dendritiques</i>	20
a. Types cellulaires	20
b. Reconnaissance des signaux de danger	21
c. Phagocytose	23
d. Présentation d'antigènes	25
2. <i>Activation de la réponse effectrice</i>	28
3. <i>Immunothérapie anti-tumorale</i>	31
III. VIROTHERAPIE ANTI-TUMORALE	33
1. <i>Principe et généralités</i>	33
2. <i>Principaux virus oncolytiques</i>	34
a. Virus à ADN	34
i. Adénovirus (ADV).....	34
ii. Herpes virus	37
iii. Poxvirus	38
iv. Parvovirus.....	39
b. Virus à ARN.....	39
i. Virus de la Maladie de Newcastle – Newcastle Disease Virus.....	39
ii. Virus de la Stomatite Vésiculaire – Vesicular Stomatitis Virus	40
iii. Réovirus	41
iv. Autres virus oncolytiques à ARN	42
3. <i>Virus de la Rougeole</i>	42
a. Souches sauvage et vaccinales	42
i. Pathologie et vaccination.....	42

ii.	Récepteurs et tropisme.....	44
iii.	Protéines virales et cycle réplicatif.....	46
iv.	Effets cytopathiques.....	49
b.	Utilisation du virus de la rougeole en virothérapie anti-tumorale.....	49
i.	Surexpression de CD46.....	49
ii.	Etudes précliniques et cliniques.....	50
4.	<i>Virothérapie anti-tumorale et système immunitaire</i>	51
a.	Rôle inhibiteur du système immunitaire.....	51
i.	Elimination des virus oncolytiques.....	51
ii.	Moyens de contournement.....	53
b.	Synergie entre virothérapie et système immunitaire.....	53
i.	Amélioration de l'activité anti-tumorale.....	53
ii.	Virus modifiés.....	54
iii.	Molécules de danger.....	56
IV.	OBJECTIFS DE LA THESE.....	58
	RÉSULTATS.....	61
I.	ACTIVITE ONCOLYTIQUE DE LA SOUCHE VACCINALE DU VIRUS DE LA ROUGEOLE.....	62
1.	<i>Article</i>	62
2.	<i>Données supplémentaires</i>	83
a.	Expression de CD46 dans les lignées de mésothéliome.....	83
b.	Rôle du CD46 dans l'infection par le virus MV oncolytique.....	84
c.	Suivi de l'infection en microscopie Time-Lapse.....	85
II.	UTILISATION D'UN VIRUS PRESENTANT DES PROPRIETES PRO-APOPTOTIQUES AUGMENTEES.....	87
III.	ACTIVATION DE LA REPONSE ANTI-TUMORALE.....	90
1.	<i>Maturation des cellules dendritiques</i>	90
2.	<i>Activation des réponses lymphocytaires T</i>	94
IV.	INDUCTION D'UNE MORT IMMUNOGENE PAR LE VIRUS DE LA ROUGEOLE.....	98
1.	<i>Protéines de réponse au choc thermique</i>	98
2.	<i>Calréticuline</i>	102
3.	<i>Protéine High-Mobility Group Box-1</i>	104
4.	<i>Interleukine-10</i>	107
5.	<i>Autres molécules immunogènes</i>	107
	DISCUSSION.....	109
	BIBLIOGRAPHIE.....	116
	ANNEXES.....	143

ABRÉVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADP : Adénosine Di-Phosphate
ADV : Adénovirus
Apaf-1 : Apoptotic peptidase activating factor-1
ARN : Acide Ribonucléique
ASC : Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase recruitment domain
ATP : Adénosine Tri-Phosphate
Bak : Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax : Bcl-2-associated X protein
Bcl-2 : B-cell lymphoma-2
BH3 only : Bcl-2-Homology domain 3 only
CAR : Coxsackie-Adenovirus common Receptor
CASPase : Cysteiny l ASPartate-specific proteases
CCL : Chemokine (C-C motif) Ligand
CCP : Complement Control Protein repeat
CCR : Chemokine (C-C motif) Receptor
CLIP : Class II-associated Ii-derived Peptide
CLR : C-type Lectine Receptors
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CP : Cyclophosphamide
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigènes
CRD : Carbohydrate Recognition Domain
cSMAC : central Supramolecular Activation Complex
CTL : Lymphocyte T Cytotoxiques
CTLA-4 : Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4
CXCL : Chemokine (C-X-C motif) Ligand
DAI : DNA-dependent Activator of IFN-regulatory factors
DAMP : Damage-Associated Molecular Pattern
DC : Cellule Dendritique
DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Non-integrin
EGF-R : Epidermal Growth Factor-Receptor

eIF2 α : eukaryotic Initiation Factor 2 α
epR : epithelial cell Receptor
ERAD : Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation
ERp57 : Endoplasmic Reticulum protein 57 kDa
FADD : Fas-Associated Death Domain
GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
Gp96 : Glycoprotéine 96 kDa
HER2/neu : Human Epidermal growth factor Receptor 2
HMGB-1 : High-Mobility Group Box-1
HSP : Heat Shock Protein
HSV : Herpes simplex virus
ICAM : Intercellular Adhesion Molecule
IFN : Interféron
iHDAC : inhibiteur d'Histone Déacetylase
IL : Interleukine
KIR : Killer cell Inhibitory Receptor
LDL : Low-Density Lipoprotein
LFA-1 : Lymphocyte Function-associated Antigen-1
LOX-1 : Lectin-like Oxidized low-density lipoprotein receptor-1
LPS : Lipopolysaccharide
LRP : LDL-receptor-Related Protein
MBL : Mannose-Binding Lectin
MCP : Membrane Cofactor Protein
mCRP : membrane Complement Regulatory Protein
MDA-5 : Melanoma Differentiation-Associated gene-5
MIC : MHC class I Chain-related
MP : Matrix Protein
MSU : Monosodium Urate
MUC-1 : Mucin-1
MV : Measles Virus
NALP3 : NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
NDV : Newcastle Disease Virus
NF- κ B : Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NK : Natural Killer
NLR : NOD-Like Receptor
PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern
pDC : Cellule Dendritique Plasmacytoïde
PKR : Protein Kinase RNA-activated
PRR : Pattern Recognition Receptor
RAGE : Receptor for Advanced Glycation End products
Ras : Rat sarcoma
RE : Réticulum Endoplasmique
RIG-I : Retinoic acid-Inducible Gene-I
RIP : Receptor Interacting Protein
RLR : RIG-I-Like-Receptor
RNS : Reactive Nitrogen Species
ROS : Reactive Oxygen Species
SCR : Short Consensus Repeats
SLAM : Signaling Lymphocyte-Activation Molecule
SP : Surfactant Protein
SR : Scavenger Receptor
ST13 : Suppression of Tumorigenicity-13
STP : Serine, Threonine and Proline-rich
TAP : Transporter associated with Antigen Processing
TCR : T Cell Receptor
TGF- β : Transforming Growth Factor- β
Th : T helper
TLR : Toll-Like Receptor
TNF- α : Tumor Necrosis Factor Receptor- α
TNF-R : Tumor Necrosis Factor Receptor
TRADD : TNF Receptor-Associated Death Domain
TRAIL : TNF-Related-Apoptosis-Induced-Ligand
Treg : T régulateur
ULBP : UL16-Binding Protein
VPA : Valproic acid
VSV : Vesicular Stomatitis Virus

INTRODUCTION

Les traitements anti-tumoraux conventionnels par chimiothérapie ou radiothérapie visent à éliminer les cellules tumorales en induisant la mort cellulaire. Le traitement doit alors permettre d'éliminer la tumeur tout en préservant au maximum les cellules saines de l'organisme, la principale difficulté résidant justement dans le développement de ce ciblage spécifique. Dans la majorité des cas, les traitements de chimiothérapie exploitent ainsi les différences entre les capacités de prolifération des cellules malignes et celles des cellules saines. Les cellules malignes présentent souvent des déficiences au niveau du contrôle du cycle cellulaire et tendent par conséquent à se multiplier de façon incontrôlée. En contrepartie, ces cellules deviennent plus sensibles à des agents chimiques capables de cibler les mécanismes du cycle cellulaire.

Les traitements développés jusqu'à ce jour ont permis une amélioration considérable de la prise en charge clinique des pathologies cancéreuses. Néanmoins, pour certains types de cancers, cibler uniquement la mort des cellules tumorales se révèle parfois insuffisant, notamment parce que des variants tumoraux résistants au traitement peuvent être sélectionnés au sein de la tumeur. Actuellement, les nouveaux traitements visent donc à combiner différentes stratégies thérapeutiques afin de minimiser les risques d'échappement des tumeurs.

Dans cette optique, de nombreux travaux ont montré que, suite à certains traitements anti-tumoraux, la mort cellulaire pouvait être associée à l'activation d'une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique. Cette implication du système immunitaire, capable de compléter l'effet cytotoxique direct du traitement anti-tumoral, permettrait d'éliminer totalement les cellules cancéreuses de l'organisme, voire de développer une mémoire immunitaire capable de prévenir l'apparition de récurrences. L'immunothérapie anti-tumorale apparaît donc comme une alternative intéressante pour le traitement des cancers résistants aux thérapies classiques.

I. Mort cellulaire

1. Types de morts cellulaires

a. Apoptose

L'apoptose (ou mort cellulaire de type I) est une mort cellulaire dite « programmée » : les cellules de l'organisme possèdent en effet de façon constitutive les mécanismes intracellulaires qui permettent, en réponse à certains stimuli, de déclencher la mort cellulaire par apoptose. La mort apoptotique est un processus physiologique dont les fonctions lors du développement (*Penalosa et al., 2006*), de la défense contre les pathogènes (*Barber, 2001 ; Marriott & Dockrell, 2006*) et les cellules malignes (*Cotter, 2009*), ou du renouvellement des cellules de l'organisme par exemple, a été largement étudié. Plusieurs changements morphologiques caractérisent la mort par apoptose : contraction de la cellule, « bourgeonnement » de la membrane plasmique (« blebbing »), condensation de la chromatine et fragmentation de l'ADN nucléaire en segments réguliers, pour aboutir finalement à une fragmentation de la cellule en corps apoptotiques (*Kerr et al., 1972*). Lors de l'apoptose, l'intégrité de la membrane plasmique est conservée et évite ainsi la fuite des molécules intracellulaires dans l'environnement. Les corps apoptotiques sont alors éliminés par les cellules phagocytaires dans un contexte non inflammatoire, évitant ainsi le déclenchement d'une réponse immunitaire. L'apoptose est ainsi souvent considérée comme une mort non immunogène (*Böhm & Schild, 2003*).

Au sein des cellules, il existe une balance constante entre des signaux pro- et anti-apoptotiques. Les molécules de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) ont ainsi un rôle prépondérant dans la régulation de l'apoptose (*Youle & Strasser, 2008*). Suite à certains stimuli (dommages à l'ADN, déficit en signaux de survie, ligation des récepteurs de mort, ...), cette balance peut être déséquilibrée en faveur des signaux pro-apoptotiques et aboutir au déclenchement de l'apoptose. La phase effectrice de l'apoptose fait alors intervenir des enzymes particulières, les caspases (cysteinyl aspartate-specific proteases), dont certaines (caspases-3, -6 et -7) présentent la capacité de cliver de nombreuses cibles moléculaires au sein des cellules (*Lüthi & Martin, 2007*).

Il existe deux grandes voies d'activation des mécanismes de l'apoptose. La première est la voie intrinsèque ou « mitochondriale » (Figure 1) qui est activée par des stress intracellulaires, par exemple des dommages à l'ADN. Ce type de signaux provoque l'activation de molécules de type « BH3 only » (Bcl-2-Homology domain 3 only), alors capables de se lier à la principale molécule anti-apoptotique, Bcl-2. De cette façon, Bcl-2 perd

son activité inhibitrice vis-à-vis de molécules pro-apoptotiques telles que Bak ou Bax. Ces molécules peuvent alors s'ancrer dans la membrane mitochondriale externe et permettre le passage de molécules de la mitochondrie vers le cytoplasme (*Chipuk & Green, 2008*). Cette perte de l'intégrité membranaire des mitochondries s'accompagne notamment de la fuite vers le cytoplasme de cytochrome-C (*Liu et al. 1996*) qui forme l'apoptosome avec Apaf-1 (Apoptotic peptidase activating factor-1) et la pro-caspase-9 (*Zou et al., 1999*). La caspase-9 activée par ce complexe peut alors à son tour activer les caspases-3, -6 et -7 et ainsi enclencher la phase effectrice de l'apoptose.

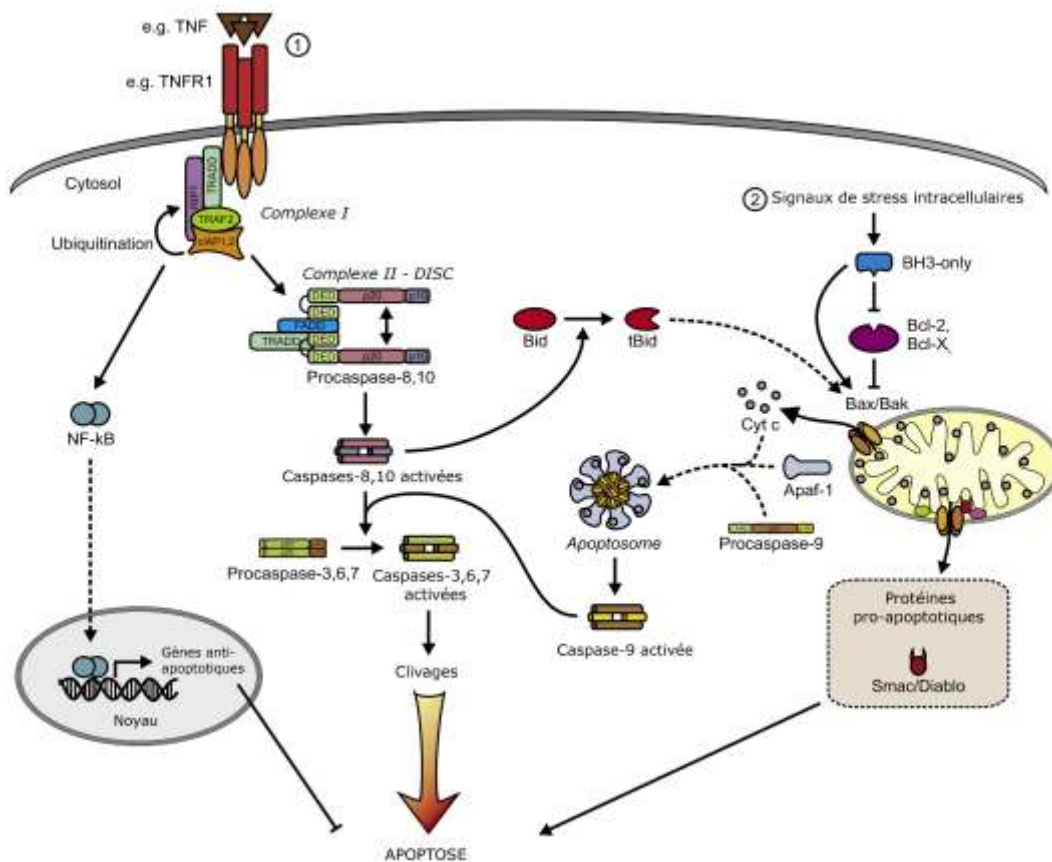


Figure 1 : Voies de l'apoptose

Induction de l'apoptose par les récepteurs de mort (voie extrinsèque, 1) et par la voie mitochondriale (voie intrinsèque, 2). (d'après Duprez et al., 2009)

La voie extrinsèque est activée par la ligation de récepteurs de mort (CD95/Fas, Tumor Necrosis Factor Receptors TNF-R1 et TNF-R2, TNF-Related-Apoptosis-Induced-

Ligand Receptors TRAIL-R1 et TRAIL-R2) sur la membrane plasmique (*Wilson et al., 2009*). Dans le cas des récepteurs CD95 et TRAIL-R, l'induction de l'apoptose passe par le recrutement de l'adaptateur FADD (Fas-Associated Death Domain) au niveau des domaines cytoplasmiques des récepteurs puis par l'activation de la caspase-8. Le cas du TNF-R1 est plus complexe puisque sa ligation peut soit activer les voies de survie via NF- κ B, soit induire l'apoptose par la formation du « TNF-R1 complex II » contenant TRADD (TNF Receptor-Associated Death Domain) et FADD (Figure 1). Ce complexe induit ensuite l'activation des caspases initiatrices 8 et 10 (*Micheau & Tschopp, 2003 ; Wang et al., 2008*). Ces caspases induisent à leur tour l'activation des caspases effectrices en aval. Parallèlement, la caspase-8 clive la molécule Bid qui permet d'amplifier l'apoptose médiée par les récepteurs de mort en activant la voie apoptotique mitochondriale (*Luo et al., 1998*).

b. Nécrose

La mort nécrotique (ou mort cellulaire de type III) a souvent été associée à une mort accidentelle résultant de dommages cellulaires irréversibles causée par des agents (pathogènes, agents chimiques, traumatismes, environnement extracellulaire, ...) capables d'interférer avec les mécanismes vitaux de la cellule. Les principaux changements morphologiques causés par la nécrose sont un gonflement de la cellule, une dilatation de certains organites (mitochondries, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi) et surtout une perte précoce de l'intégrité membranaire (*Festjens, 2006 ; Degterev & Yuan, 2008*).

De nombreux travaux font maintenant état d'un programme cellulaire déterminant la mort par nécrose (*Vandenabeele et al., 2010*). Cette mort nécrotique programmée, ou nécroptose, ne dépend alors plus d'agents physiques ou chimiques induisant une nécrose « accidentelle » mais de signaux extracellulaires intégrés par des récepteurs. La nécroptose peut ainsi être déclenchée par l'engagement de récepteurs de mort (CD95/Fas, TNF-R1, TNF-R2, TRAIL-R1, TRAIL-R2) impliqués dans la voie extrinsèque de l'apoptose, ou plus marginalement par la fixation de ligands sur certains récepteurs de l'immunité innée (Pattern Recognition Receptors). Le récepteur le plus étudié dans ce contexte est le TNF-R1. Dans le cas de la nécrose « programmée », la formation du « TNF-R1 complex II » en aval de ce récepteur aboutit à la formation d'un complexe appelé « nécrosome » (*Declercq et al., 2009*). Ce complexe de signalisation faisant intervenir les protéines RIP-1 (Receptor Interacting Protein-1) et RIP-3 provoque notamment la formation d'espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS) et de l'azote (Reactive Nitrogen Species, RNS) capables de provoquer des dommages au niveau des membranes lysosomale et plasmique.

Des changements morphologiques similaires à la mort par nécrose sont aussi observés *in vitro* dans le cas où des cellules induites en apoptose ne sont pas prises en charge par des cellules phagocytaires ; on parle alors de nécrose secondaire (Wyllie *et al.*, 1980). L'existence de cette mort demeure controversée *in vivo* puisqu'elle peut être considérée comme un artefact dû à l'absence de cellules phagocytaires dans des conditions de culture *in vitro*. Pourtant, certains définissent la nécrose secondaire comme la dernière étape physiologique de la mort cellulaire par apoptose, notamment pour les organismes unicellulaires (Silva, 2010). Chez les organismes pluricellulaires, son apparition *in vivo* dépend soit de l'absence de cellules phagocytaires (par exemple dans la lumière de l'intestin, des voies respiratoires ou des acini), soit de déficiences au niveau des capacités d'efférocytose, c'est-à-dire d'élimination des cellules apoptotiques par les cellules phagocytaires. Ces déficiences peuvent notamment intervenir dans le développement de certaines pathologies, par exemple des maladies auto-immunes, si la nécrose secondaire provoque l'activation de la réponse inflammatoire.

c. Autophagie

L'autophagie est un processus d'auto-dégradation de composants cytoplasmiques de la cellule. Plusieurs rôles physiologiques potentiels ont été décrits pour ce processus : réponse à un milieu pauvre en nutriments, recyclage des organites, élimination de pathogènes intracellulaires, ou encore présentation d'antigènes (Mizushima, 2005). Suite à certains stimuli, par exemple une déprivation de la cellule en nutriments, des autophagosomes se forment. Ces structures délimitées par une double membrane lipidique englobent une partie du cytoplasme, y compris certains organites, avant de fusionner avec des endosomes puis des lysosomes (Figure 2). C'est dans ces autophagolysosomes que seront dégradées les macromolécules. Ce mécanisme permet à la cellule de recycler certains de ses constituants : les acides aminés récupérés serviront par exemple à la synthèse de glucose, à la production d'énergie, ou encore à la synthèse de nouvelles protéines.

L'autophagie est un mécanisme physiologique permettant d'accroître la survie cellulaire en réponse à différents stress. Cependant, une autophagie excessive peut aboutir à la mort de la cellule (mort cellulaire de type II). Même si l'on peut davantage considérer l'autophagie comme un échec des mécanismes de survie plutôt que comme un processus de mort cellulaire programmée (Levine & Yuan, 2005), de nombreuses observations de morts cellulaires par autophagie sont répertoriées, notamment dans le cadre du développement

(Bursch, 2001). La mort cellulaire par autophagie peut être provoquée par une trop forte dégradation des composants cellulaires, une induction des voies apoptotiques, ou une dégradation de facteurs de survie intracellulaires (Yu et al., 2008). Cette mort se caractérise alors par une vacuolisation et une dégradation du contenu cytoplasmique associées à une faible condensation de la chromatine sans fragmentation de l'ADN ni formation de corps apoptotiques.

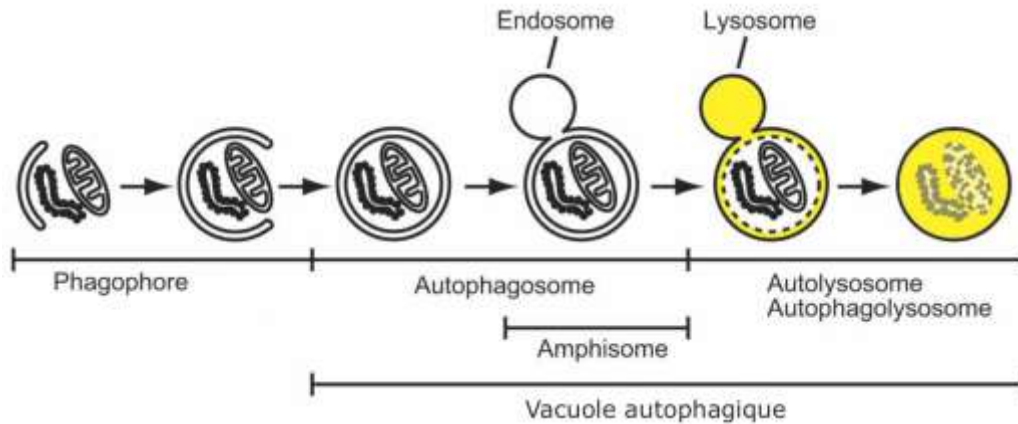


Figure 2 : Formation des autophagosomes

Après la formation d'une double membrane lipidique entourant les organites à éliminer, les autophagosomes fusionnent avec les voies de dégradation lors du processus d'autophagie. La dégradation des macromolécules permet ensuite leur recyclage sous forme notamment d'acides aminés. (d'après Mizushima, 2007)

d. Autres types de morts cellulaires

De nombreux types de morts cellulaires sont décrits dans la littérature ; il est difficile d'en établir une classification précise, certains pouvant davantage être considérés comme des sous-types des morts de types I, II ou III, voire uniquement comme des mécanismes situés en amont de ces morts cellulaires et pouvant mener au déclenchement de celles-ci.

La catastrophe mitotique résulte d'une entrée inappropriée en mitose qui provoque une séparation aberrante du matériel génétique et des défauts de ploïdie (Vakifahmetoglu, 2008). Des dommages à l'ADN, une instabilité des microtubules ou une mauvaise régulation des points de contrôle du cycle cellulaire peuvent ainsi provoquer une mitose imparfaite

aboutissant à la mort des cellules filles. Certains agents utilisés en chimiothérapie sont notamment capables d'induire ces dommages ou ces dérégulations et de mener à une catastrophe mitotique (*Morse et al., 2005 ; Robinson et al., 2007 ; Portugal et al., 2010*).

La pyroptose (du grec « pyro », « fièvre ») est un processus de mort cellulaire qui se caractérise par l'activation de la caspase-1. Cette caspase n'intervient pas dans les mécanismes de l'apoptose mais est impliquée dans la maturation de certaines molécules, notamment dans l'activation des interleukines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18. Dans le cadre de la pyroptose, la caspase-1 provoque la digestion de l'ADN par des nucléases, le gonflement de la cellule et la rupture de la membrane plasmique, permettant ainsi aux molécules pro-inflammatoires d'être relâchées dans le milieu extracellulaire (*Fink & Cookson, 2006*). Différents agents pathogènes comme *Salmonella* ou *Legionella* (*Bergsbaken et al., 2009*) mais aussi des stimuli non infectieux (*Frantz et al., 2003*) sont ainsi capables de provoquer le déclenchement de la pyroptose.

2. Induction de la mort cellulaire en thérapie anti-tumorale

Les traitements anti-tumoraux par radiothérapie ou chimiothérapie ont pour objectif d'induire la mort des cellules tumorales. La radiothérapie, c'est-à-dire l'utilisation de rayonnements ionisants ciblant les cellules tumorales, vise principalement à induire des dommages sur l'ADN : dommages touchant les bases azotées, cassures simple et double-brin, liaisons covalentes ADN-protéines ou ADN-ADN (*Burdak-Rothkamm & Prise, 2009*). Parmi ces types de dommages, les cassures double-brin de l'ADN sont les mieux corrélées avec l'induction de la mort cellulaire. Ces cassures peuvent être induites par l'effet direct des radiations sur la molécule d'ADN ou par la formation de radicaux libres. Les cellules possèdent des mécanismes performants de réparation de l'ADN permettant de prendre en charge ces dommages. Cependant, dans le cas des cellules tumorales, la dérégulation des points de contrôle de la mitose et la forte capacité de prolifération cellulaire induisent une entrée en mitose trop précoce, alors que la réparation de l'ADN n'est pas achevée. Ces dommages provoquent donc l'apparition d'aberrations chromosomiques, par exemple des défauts de ploïdie, et *in fine* la mort par catastrophe mitotique des cellules filles. Les rayonnements ionisants peuvent cependant aussi induire la mort des cellules par apoptose, notamment dans le cas où les cellules ciblées sont des cellules embryonnaires ou des cellules hématopoïétiques (*Ross, 1999*).

Les molécules utilisées en chimiothérapie se divisent en plusieurs classes : agents alkylants (cisplatine, cyclophosphamide), anti-métabolites (5-fluoro-uracile, fludarabine), antibiotiques anti-tumoraux (anthracyclines, actinomycine-D), inhibiteurs de la topoisomérase (camptothécine) et alcaloïdes végétaux. La majorité de ces molécules agissent directement ou indirectement sur le métabolisme de l'ADN en inhibant sa réplication ou sa transcription. Elles provoquent ainsi l'arrêt des divisions cellulaires et la mort des cellules à fort potentiel prolifératif. Les alcaloïdes végétaux, principalement divisés entre les taxanes (paclitaxel, docetaxel) et les vinca-alcaloïdes (vinblastine), agissent eux sur les microtubules et la formation du fuseau mitotique nécessaire à la division cellulaire : alors que les taxanes induisent une augmentation de la stabilité des microtubules (*Schiff et al., 1979*), provoquant ainsi la formation de fuseaux mitotiques multiples, les vinca-alcaloïdes quant à eux inhibent la polymérisation de ces microtubules (*Bensch & Malawista, 1968*). Le blocage de la polymérisation ou de la dépolymérisation des microtubules provoque l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire et l'arrêt de la mitose. Les cellules tumorales traitées par des vinca-alcaloïdes sont capables de « s'adapter » à un arrêt prolongé de la mitose (*Rieder & Maiato, 2004*) pour entrer en phase G1. Ces cellules peuvent ensuite soit continuer de se diviser soit exécuter un programme de mort cellulaire (*Tao et al., 2005 ; Weaver & Cleveland, 2005*).

3. Immunogénicité de la mort cellulaire

L'immunogénicité de la mort cellulaire par nécrose est souvent opposée au caractère tolérogène de la mort par apoptose. La mort par nécrose est en effet associée aux traumatismes et aux dommages cellulaires induits par des facteurs extérieurs et permet le déclenchement d'une réponse inflammatoire. L'apoptose, par son caractère programmé, intervient notamment dans des processus physiologiques qui nécessitent la tolérance du système immunitaire vis-à-vis des antigènes du soi afin d'éviter le développement de réponses auto-immunes.

La distinction entre l'immunogénicité de la nécrose et de l'apoptose apparaît pourtant de moins en moins nette. Si la forte immunogénicité de la nécrose, même dans le cas de la nécroptose programmée, n'est pas remise en cause, la capacité de la mort par apoptose à déclencher ou non une réponse inflammatoire est elle confrontée à de nombreuses données récentes.

Lors de la nécrose, la perte de l'intégrité membranaire (voir partie I.1.b) permet la libération de molécules intracellulaires reconnues comme signaux de danger par les cellules de l'immunité. Ainsi, l'acide urique, HMGB-1 (High-Mobility Group Box-1), les protéines de la famille HSP (Heat Shock Protein), les interleukines IL-1 α et IL-33 ou même l'ADN participent à l'activation d'une réponse inflammatoire (*Rock et al., 2010*). La mort cellulaire par apoptose est quant à elle souvent considérée comme une mort non immunogène (voir partie I.1.a) : les corps apoptotiques sont pris en charge par les cellules phagocytaires de l'immunité sans déclenchement d'une réponse immunitaire. Pourtant, de nombreux travaux ont montré que dans certains cas, et notamment à la suite de certains traitements anti-tumoraux, la phagocytose de corps apoptotiques peut conduire à l'induction d'une réponse immunitaire (*Boisteau et al., 1997 ; Albert et al., 1998 ; Henry et al., 1999*). L'immunogénicité de la mort cellulaire dépend de la libération, dans le milieu extracellulaire, de molécules de danger endogènes (*Matzinger, 1994*). Ces molécules de danger associées aux dommages cellulaires (Damage-Associated Molecular Patterns, DAMP) sont retenues à l'intérieur des cellules vivantes et dans le cas d'une mort cellulaire non immunogène (Figure 3). Ainsi, lors d'une apoptose « classique », le maintien de l'intégrité membranaire des corps apoptotiques permet d'éviter la fuite de molécules nucléaires ou cytoplasmiques vers le milieu extracellulaire. Au contraire, la perte de l'intégrité membranaire et la libération de molécules de danger peut induire l'activation de cellules de l'immunité innée ; dans ce contexte de danger, la phagocytose des cellules mortes peut alors déclencher une réponse immunitaire.

L'identification des molécules de danger associées à la mort cellulaire, c'est-à-dire des facteurs pouvant définir l'immunogénicité de cette mort, est un enjeu important pour l'amélioration des stratégies d'immunothérapie, notamment dans le cadre des traitements anti-tumoraux. Les DAMP sont reconnus par certaines cellules du système immunitaire, en particulier les monocytes, macrophages et cellules dendritiques (DC), et sont alors capables d'induire leur activation. Ils sont le pendant endogène des PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) dérivés des pathogènes et dont on retrouve des récepteurs spécifiques (Toll-like Receptors (TLR), NOD-like Receptors (NLR), ...) sur les cellules de l'immunité innée. Différentes molécules de danger endogènes ont ainsi été identifiées pour leurs capacités à activer une réponse immunitaire en réponse à la mort cellulaire.

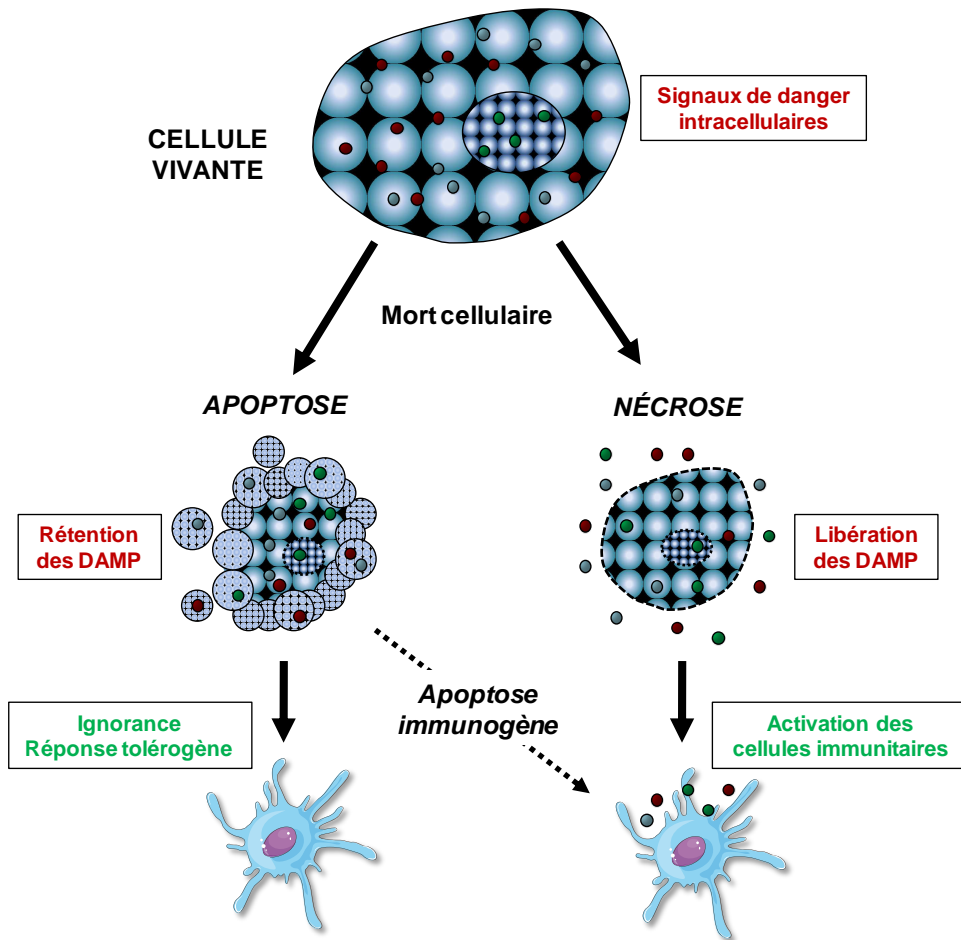


Figure 3 : Libération des signaux de danger endogènes lors de la mort cellulaire

Les signaux de danger endogènes (DAMP) potentiels sont retenus à l'intérieur des cellules vivantes et des corps apoptotiques. Lors de la nécrose ou d'autres types de morts cellulaires impliquant une perte de l'intégrité membranaire, ces facteurs sont libérés dans l'environnement et interviennent alors dans l'activation des cellules de l'immunité innée. En cas d'apoptose à caractère immunogène, certains de ces DAMP seraient ainsi libérés dans le milieu extracellulaire et permettraient l'activation de la réponse immunitaire. (d'après Kono & Rock, 2008)

a. Protéines de choc thermique – Heat Shock Proteins (HSP)

La famille des Heat Shock Proteins (HSP) regroupe plusieurs protéines chaperones dont les premiers membres furent identifiés lors de l'étude des mécanismes de réponse aux chocs thermiques (*Tissières et al., 1974 ; Moran et al., 1978*). Ces protéines, conservées au cours de l'évolution, se différencient entre elles par leurs fonctions, leurs localisations cellulaires et leurs tailles. Hsp90 (HSP de 90 kDa) et Hsp70 (70 kDa) sont ainsi exprimées dans le cytoplasme, Gp96 (glycoprotéine de 96 kDa) dans le réticulum endoplasmique, et Hsp60 (60 kDa) dans les mitochondries. Elles ont un rôle essentiel dans le repliement, la prévention de l'agrégation et le maintien de la bonne conformation des polypeptides néosynthétisés, notamment suite aux stress cellulaires (choc thermique, stress chimique, forte synthèse protéique, ...). Les protéines HSP sont présentes de façon constitutive dans toutes les cellules de l'organisme. Cependant, certaines sont inductibles en cas de stress afin de répondre à l'accumulation de protéines présentant une mauvaise conformation (*Fink, 1999*). L'interaction avec les protéines partenaires se fait alors par reconnaissance de résidus hydrophobes.

Outre leurs fonctions de chaperone et de réponse au stress, les protéines HSP sont aussi impliquées dans l'activation du système immunitaire : directement d'une part, en agissant comme une « cytokine » reconnues par les cellules immunitaires (*Calderwood et al., 2007*), mais aussi par des mécanismes indirects en intervenant par exemple dans la présentation des antigènes (*Li et al., 2002*).

De nombreux travaux ont démontré la capacité des protéines de la famille HSP à activer directement les cellules de l'immunité (monocytes, macrophages, DC). Cette activation passerait notamment par la fixation des HSP sur les récepteurs CD14 (*Asea et al., 2000*), TLR2 (*Vabulas et al., 2001*), TLR4 (*Ohashi et al., 2000 ; Bulut et al., 2002*) ou CCR5 (*Floto et al., 2006 ; Whittall et al., 2006*). Cependant, depuis 2002 de nombreuses études ont montré que l'effet immuno-activateur des HSP via ces récepteurs était dû à la présence de contaminants capables de se lier à ces protéines (*Wallin et al., 2002 ; Tsan & Gao, 2009*). Il a ainsi été démontré que les HSP étaient capables d'interagir avec certains ligands des TLR 2,4 et 5 (*Warger et al., 2006 ; Ye & Gan, 2007*), respectivement le Palmitoyl-3-Cys-Ser-(Lys)₄, les lipopolysaccharides (LPS) et la flagelline. *Bendz et al. (2008)* ont eux montré que l'activation des DC par Hsp70 via CCR5 était due à une contamination par des résidus d'ATP ou d'ADP (ligands CCR5) lors de l'étape de purification de la protéine recombinante. L'activité « cytokinique » directe des protéines HSP est ainsi fortement remise en cause,

même si l'interaction de certains ligands des TLR avec les HSP permettrait tout de même de potentialiser leur activité et d'améliorer ainsi la détection des signaux de danger par les cellules immunitaires.

De par leur rôle de chaperone et leur capacité à interagir avec de nombreuses séquences protéiques, les protéines HSP présentent la propriété de lier des peptides antigéniques (*Nieland et al., 1996 ; Ishii et al., 1999 ; Linderoth et al., 2000*). Des travaux précédents avaient montré que la protéine de stress Gp96 purifiée à partir de cellules de sarcome permettait de protéger des souris contre un challenge avec des cellules tumorales de la même lignée, mais pas contre des cellules de sarcome issues de lignées différentes (*Srivastava et al., 1986*). De nombreux travaux ont ensuite montré que l'utilisation de protéines HSP dérivées de cellules tumorales ou de cellules infectées par un virus permettait d'activer une réponse immunitaire spécifique (*Udono et al., 1994 ; Blachere et al., 1997*). En 1994, *Srivastava et al.* émettent l'hypothèse que la capacité des protéines HSP à fixer des peptides et à activer les cellules immunitaires est liée à la propriété qu'ont ces protéines de convoier les peptides antigéniques vers les voies de présentation du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) : d'une part pour les peptides intracellulaires vers la voie classique du CMH de classe I (CMH I), d'autre part pour les peptides exogènes phagocytés qui peuvent alors être présentés sur le CMH de classe II, voire sur le CMH I via les mécanismes de présentation croisée (*Srivastava et al., 1994*). Au niveau des voies de présentation endogènes, il a ainsi notamment été montré que Hsp90 était capable de se lier aux protéines mal conformées du cytoplasme et de participer à leur adressage vers les mécanismes d'ubiquitination puis le protéasome (*Kunisawa & Shastri, 2006*).

La capture de protéines HSP exogènes par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) est impliquée dans la présentation croisée des antigènes. Les HSP jouent alors le rôle de « transporteurs de peptides » reconnus par les CPA. Ainsi, le blocage de Hsp70, Hsp90 et Gp96 dans des lysats cellulaires inhibe les capacités d'activation de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques par les CPA (*Binder & Srivastava, 2005*). Les récepteurs CD91/LRP (LDL-receptor-Related Protein) pour Hsp90, Hsp70, Hsp60 et gp96 (*Binder et al., 2000 ; Basu et al., 2001*), LOX-1 (Lectin-like Oxidized low-density lipoprotein receptor-1) (*Delneste et al., 2002*) et CD40 pour Hsp70 (*Becker et al., 2002*) ont parallèlement été décrits comme récepteurs des protéines HSP sur les DC et les macrophages. L'efficacité de présentation croisée des peptides grâce aux complexes HSP-peptides résiderait notamment dans la participation des HSP à la translocation des peptides vers le cytoplasme puis le protéasome au sein des CPA (*Udono et al., 2009*).

Les protéines HSP sont souvent surexprimées à l'intérieur des cellules tumorales et participent à leur tumorigénicité (*Jäättelä, 1995*). Il a aussi été montré que les cellules tumorales pouvaient exprimer certaines HSP à leur surface (*Multhoff et al., 1995*). Les stress induits par certains traitements anti-tumoraux provoquent la surexpression des HSP (*Moehler et al., 2003*) et participent ainsi à l'immunogénicité de la mort cellulaire et à l'activation de la réponse immunitaire anti-tumorale. Dans le cas de la nécrose notamment, la perte d'intégrité membranaire provoque la libération de protéines HSP dans le milieu extracellulaire (*Basu et al., 2000*).

b. Calréticuline

La calréticuline est une protéine chaperone exprimée principalement dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE). Grâce à sa capacité à lier le calcium libre, elle intervient dans le stockage du calcium à l'intérieur du RE (*Baksh & Michalak, 1991*). Elle possède aussi la capacité de se lier aux protéines N-glycosylées et participe à leur repliement (*Peterson et al., 1995*).

La calréticuline est aussi présente à la surface des cellules où elle est impliquée dans l'adhérence (*Coppolino et al., 1997*) et la migration cellulaires (*Orr et al., 2003*), mais aussi dans la phagocytose des cellules apoptotiques (*Ogden et al., 2001 ; Gardai et al., 2005*). Le stress cellulaire est d'ailleurs souvent associé à une surexpression de la calréticuline et à sa translocation vers la membrane plasmique (*Heal & McGivan, 1998*). Après exposition des cellules à des agents inducteurs de stress, la translocation de la calréticuline du RE vers la membrane plasmique se ferait parallèlement à la phosphorylation du facteur de traduction eIF2 α suite au stress dans le RE et à l'activation de la caspase-8 et des mécanismes de l'apoptose (*Panaretakis et al., 2009 ; Zitvogel et al., 2010*). Associée à ERp57, la calréticuline passerait ensuite du RE vers la membrane plasmique via l'appareil de Golgi.

La calréticuline partage avec les protéines Hsp90, Hsp70 et Gp96 le récepteur CD91/LRP lui permettant d'être reconnue par les CPA (*Basu et al., 2001*). Un autre récepteur de la calréticuline exprimé notamment par les macrophages et les DC, le Scavenger Receptor-A (SR-A), a aussi été décrit (*Berwin et al. 2003*). Au niveau des mécanismes de phagocytose, la calréticuline joue le rôle de « eat me signal », c'est-à-dire que la reconnaissance par les CPA de ce signal moléculaire à la surface des cellules mortes « autorise » leur internalisation. L'augmentation de la quantité de calréticuline à la surface des cellules mortes se fait d'ailleurs conjointement avec la disparition du « don't eat me signal » CD47 (*Oldenborg et al., 2001*).

Des travaux récents ont décrit la calréticuline comme un signal moléculaire permettant de dicter l'immunogénicité de la mort des cellules tumorales suite à certains traitements anti-tumoraux (*Obeid et al., 2007a ; Obeid et al., 2007b*). Ainsi, le traitement de cellules tumorales murines par des anthracyclines (doxorubicine) ou leur exposition à des rayons γ ou ultraviolet-C induit la translocation de calréticuline à leur surface avant le déclenchement de l'apoptose. Cette exposition de calréticuline sur la membrane plasmique est associée à l'activation d'une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique après phagocytose des cellules apoptotiques par des DC. En effet, l'inhibition de l'expression de la calréticuline dans les cellules tumorales par ARN interférence ou le blocage de la calréticuline de surface par un anticorps spécifique inhibe l'activation de cette réponse immunitaire ; cette même réponse est restaurée par l'ajout de calréticuline recombinante sur les cellules. Dans le cas de cette apoptose « immunogène », l'exposition de la calréticuline à la surface des cellules est une étape précoce qui intervient avant même que les premiers signes de l'apoptose n'apparaissent et qui permet d'améliorer l'efficacité de phagocytose des cellules tumorales par les DC. Cependant, la maturation de ces DC dépendrait elle de la présence d'autres molécules de danger (*Obeid et al., 2007a*). Le rôle de la calréticuline dans le déclenchement des réponses anti-tumorales ouvre ainsi des perspectives intéressantes du point de vue des stratégies d'immunothérapie.

c. High-Mobility Group Box-1 (HMGB-1)

High-Mobility Group Box-1 (HMGB-1), aussi connue sous le nom d'amphotérine, est une protéine nucléaire de type non-histone capable de se lier à l'ADN sans spécificité de séquence. Elle intervient notamment dans la formation de complexes protéines-ADN et la régulation transcriptionnelle (*Zappavigna et al., 1996 ; Sutrias-Grau et al., 1999*). Sa présence au niveau du noyau est déterminée par deux séquences de localisation nucléaire.

HMGB-1 est aussi sécrétée activement par les macrophages ou les monocytes activés. Des endotoxines comme le LPS (*Wang et al., 1999*) ou des cytokines telles que le TNF- α ou l'interféron- α (IFN- α) (*Rendon-Mitchell et al., 2003*) induisent ainsi la sécrétion de HMGB-1 par ces cellules (*Gardella et al., 2002*). La sécrétion de HMGB-1 dans le milieu extracellulaire dépend notamment des modifications post-traductionnelles de la protéine : l'hyperacétylation (*Bonaldi et al., 2003*), la phosphorylation (*Youn & Shin, 2006*) ou la méthylation (*Ito et al., 2007*) permettent de prévenir la localisation nucléaire de HMGB-1 et induisent ainsi sa rétention au niveau du cytoplasme avant son adressage vers les voies de sécrétion.

La libération passive de HMGB-1 a été caractérisé dans le cadre de dommages cellulaires et de la mort par nécrose (*Degryse et al., 2001*). Cette libération est associée à l'induction d'une inflammation (*Scaffidi et al., 2002*) par activation des monocytes et des macrophages. Plus particulièrement, les travaux de *Wang et al.* ont montré que HMGB-1 agissait comme un médiateur tardif du choc septique (*Wang et al., 1999*). La protéine HMGB-1 sécrétée activement comme « cytokine » par certaines cellules de l'immunité ou libérée par les cellules endommagées et agissant comme « signal de danger » est notamment capable d'activer les monocytes (*Andersson et al., 2005*), les DC myéloïdes (*Messmer et al., 2004*) et les polynucléaires neutrophiles (*Park et al., 2003*), alors qu'elle est impliquée dans une boucle autocrine lors de la maturation des DC plasmacytoïdes (*Dumitriu et al., 2005*).

La capacité de HMGB-1 à activer les cellules de l'immunité innée dépend encore une fois de ses modifications post-traductionnelles. Lors de la nécrose, HMGB-1 est libérée sous sa forme native ou sous une forme acétylée sur les lysines 2 et 11 (*Bonaldi et al., 2003*). Dans le cas de l'apoptose, HMGB-1 est séquestrée dans le noyau avec une affinité accrue pour l'ADN (*Scaffidi et al., 2002*). Cependant, des travaux ont montré que HMGB-1 pouvait tout de même être excrétée par des cellules apoptotiques (*Bell et al., 2006*). La libération de HMGB-1 sous une forme oxydée par les ROS présente alors des propriétés tolérogènes avec une incapacité de la protéine à stimuler les cellules de l'immunité (*Kazama et al., 2008*).

Des travaux récents suggèrent que la libération de HMGB-1 par des cellules tumorales apoptotiques présente pourtant des propriétés immunogènes (*Apetoh et al., 2007*). Chez la souris, l'activation de DC myéloïdes par des cellules tumorales irradiées (rayons X) ou traitées à la doxorubicine passe ainsi par l'activation du TLR4 sur les CPA (*Apetoh et al. 2007 ; Apetoh et al., 2008*). La libération passive de HMGB-1 est aussi associée à la mort cellulaire induite par d'autres stratégies anti-tumorales telles que l'utilisation de virus oncolytiques (*Curtin et al., 2009 ; Huang et al., 2010*).

Comme décrit ci-dessus pour les protéines HSP, la diversité des partenaires potentiels de HMGB-1, dont l'ADN (ou les nucléosomes), l'ARN, l'IL-1 β , CXCL12 et le LPS (*Sims et al., 2010*), interroge pourtant sur les réelles capacités de la protéine à activer à elle seule TLR4 et à induire la présentation croisée d'antigènes tumoraux (*Sha et al., 2008*). En effet, alors que de nombreux travaux ont démontré la capacité de HMGB-1 à agir comme cytokine pro-inflammatoire, l'utilisation d'une protéine HMGB-1 hautement purifiée n'a en revanche montré que peu d'effet sur les cellules immunitaires (*Rouhiainen et al., 2007*).

Le Receptor for Advanced Glycation End products (RAGE) a été le premier récepteur identifié pour HMGB-1 (*Hori et al., 1995*). Au niveau du système immunitaire, il est exprimé faiblement sur les monocytes, les macrophages, les lymphocytes T et les DC immatures (*Brett et al., 1993 ; Ulloa & Messmer, 2006*). Sur ces cellules, la reconnaissance des complexes HMGB-1/ADN se ferait par une association RAGE/TLR9 (*Tian et al., 2007*), alors que la reconnaissance des complexes HMGB-1/nucléosomes serait elle uniquement dépendante de TLR2 (*Urbonaviciute et al., 2008*).

d. Cristaux d'acide urique

L'acide urique est un signal de danger libéré par les cellules induites en apoptose après choc thermique, traitement à la cycloheximide ou irradiation aux ultraviolets (*Shi et al., 2003*). Dans ce contexte, la forme active de l'acide urique serait composée de cristaux monosodiques d'urate (MSU). Les cristaux MSU participent ainsi à la maturation de DC exposées à des cellules endommagées et à l'activation d'une réponse immunitaire T CD8 spécifique d'antigènes *in vivo*.

Contrairement aux autres signaux de danger, l'implication de récepteurs protéiques dans l'activation des DC par les cristaux d'acide urique n'a pas été démontrée. Il a ainsi été montré que les cristaux MSU étaient capables de provoquer l'activation de DC par liaison directe de la membrane plasmique, sans doute via le cholestérol membranaire, en activant en aval la kinase Syk (*Ng et al., 2008*). Parallèlement, d'autres travaux ont montré que les cristaux MSU pouvaient être phagocytés par les DC (*Hornung et al., 2008*). Ces cristaux peuvent alors provoquer la rupture des phagosomes : ce danger « stérile » induit l'activation de l'inflammasome NALP3 (NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3) dans les DC (*Martinon et al., 2006*).

L'inflammasome est un complexe cytoplasmique intervenant dans la signalisation des NLR (*Martinon et al., 2009*). Il existe en fait plusieurs types d'inflammasomes selon le récepteur NLR impliqué. La formation de l'inflammasome aboutit au clivage des pro-caspases inflammatoires, en particulier la pro-caspase-1. La caspase-1 activée peut ensuite cliver les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 et ainsi induire leur sécrétion (Figure 4). La reconnaissance de signaux de danger tels que les cristaux MSU et l'activation de l'inflammasome provoque ainsi l'induction d'une réponse inflammatoire.

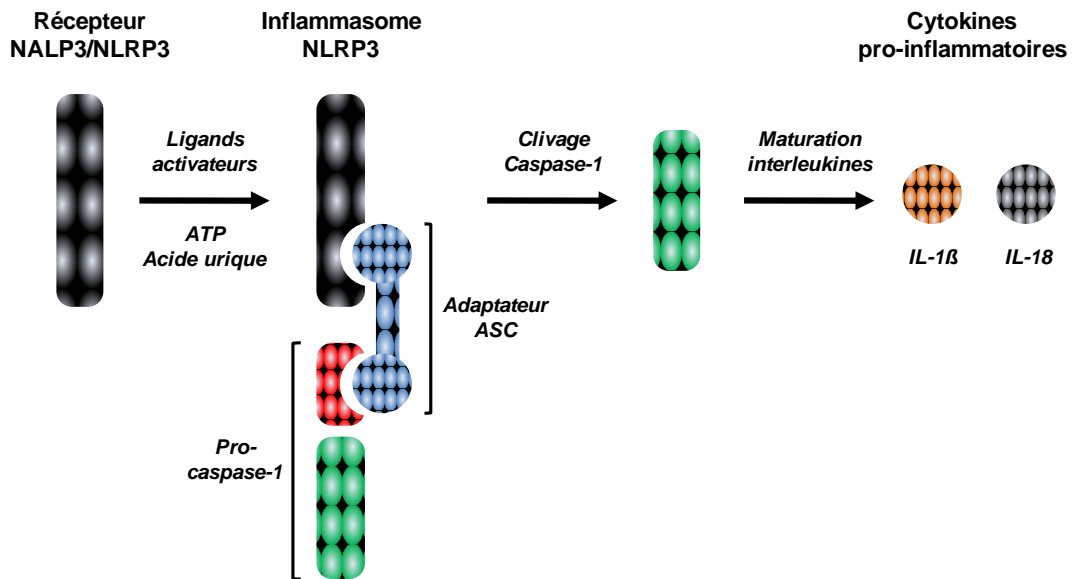


Figure 4 : Activation de l'inflammasome NALP3/NLRP3

Le récepteur NALP3/NLRP3 est activé par différents ligands (cristaux d'acide urique MSU, Adénosine Tri-Phosphate, ...). Le recrutement de la pro-caspase-1 se fait via l'adaptateur ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase recruitment domain). Après clivage de la pro-caspase-1, la caspase-1 peut elle-même cliver et activer la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18. (d'après Rock et al., 2010)

e. Adénosine tri-phosphate (ATP)

Outre ses fonctions de molécule énergétique et de composant des acides nucléiques, l'Adénosine Tri-Phosphate (ATP) possède aussi des propriétés de médiateur extracellulaire. La signalisation par l'ATP dépend de sa liaison à des récepteurs purinergiques qui interviennent dans de nombreuses fonctions physiologiques allant de la signalisation de la douleur à la vasodilatation (Bours et al. 2006). La sécrétion active d'ATP intervient ainsi notamment dans la réponse aux stress cellulaires (Selzner et al., 2004 ; Yegutkin, 2008).

L'ATP peut aussi être libérée de façon passive lors de la mort cellulaire et participer, en tant que signal de danger associé à la mort cellulaire immunogène, au déclenchement d'une réponse inflammatoire. Ainsi, plusieurs travaux ont montré que des infections bactériennes (Crane et al., 2002) ou certains traitements anti-tumoraux par chimiothérapie notamment (Martins et al., 2009) induisaient la libération d'ATP par les cellules endommagées.

Le récepteur purinergique P2X₇ est notamment exprimé à la surface des DC et des monocytes/macrophages (Bours *et al.*, 2006). Il a récemment été montré que le récepteur P2X₇ jouait un rôle important dans l'activation de l'inflammasome NALP3 par l'ATP dans ces cellules (Di Virgilio, 2007 ; Ghiringhelli *et al.*, 2009). L'activation de l'inflammasome par la liaison de l'ATP au récepteur P2X₇ aboutit ainsi à la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et d'IL-18 (Figure 4).

f. Autres molécules immunogènes

D'autres molécules endogènes sont associées à l'immunogénicité de la mort cellulaire (Rock *et Kono*, 2006). Comme HMGB-1, l'acide urique ou l'ATP, certaines de ces molécules sont des facteurs cellulaires présentant des propriétés pro-inflammatoires lorsqu'ils sont libérés dans l'environnement. Ainsi, la thiorédoxine (Bertini *et al.*, 1999) ou les galectines (Sano *et al.*, 2000) permettent le recrutement de cellules immunitaires (monocytes, macrophages, lymphocytes T, neutrophiles, ...). Les protéines S100, connues pour leur implication dans l'homéostasie intracellulaire du calcium et la régulation de l'activité du cytosquelette (Salama *et al.*, 2008), influencent aussi le recrutement des neutrophiles *in vivo* (Ryckman *et al.*, 2003).

Certains composants du micro-environnement présentent aussi des propriétés pro-inflammatoires. En effet, la mort cellulaire peut induire la libération de protéases dans la matrice extracellulaire. Elles peuvent alors y cliver certains composants et activer les cellules du système immunitaire. Ainsi, les héparanes-sulfate (Kodaira *et al.*, 2000), l'acide hyaluronique (Termeer *et al.*, 2002) ou le fibrinogène (Tobiášová-Czetoová *et al.*, 2005) sont capables d'induire la maturation des DC *in vitro*.

II. Immunité anti-tumorale

1. Activation des cellules dendritiques

a. Types cellulaires

L'ensemble des cellules de l'organisme présentent à leur surface des peptides dérivés des antigènes endogènes. Ces peptides sont présentés sur le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I). Certaines cellules du système immunitaire sont elles capables de présenter à la fois des antigènes endogènes sur leur CMH I, mais aussi des antigènes exogènes phagocytés et présentés sur le CMH de classe II ou sur le CMH I. Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles exprimant les molécules du CMH II sont les lymphocytes B, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (DC).

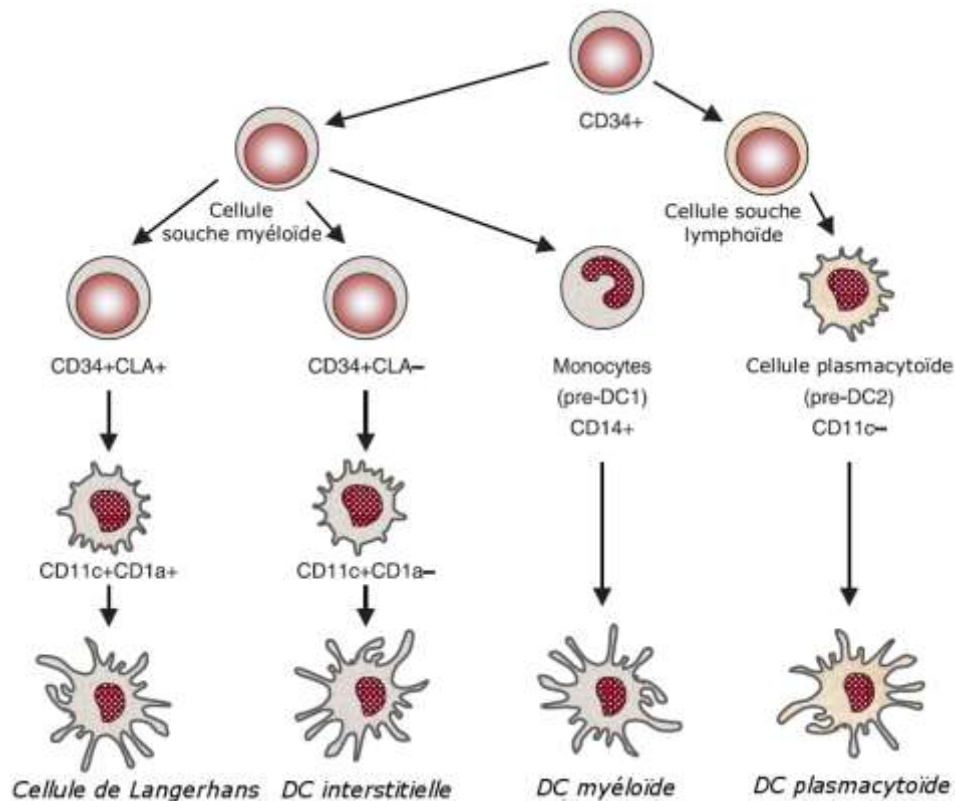


Figure 5 : Sous-types de cellules dendritiques (DC)

Les DC de Langerhans, les DC interstitielles et les DC myéloïdes dérivent d'un précurseur de la lignée myéloïde $CD11c^+$. Les DC plasmacytoïdes dérivent elles d'un précurseur lymphoïde $CD11c^-$. (d'après Schott, 2006)

Les DC sont considérées comme les meilleures CPA compte-tenu de leurs capacités à orienter de façon efficace la réponse immunitaire ; les DC sont notamment les seules cellules capables de stimuler les lymphocytes T naïfs (*Mehta-Damani et al., 1994*). Les différents types de DC dérivent d'un progéniteur hématopoïétique $CD34^+$ commun ; cependant, ces sous-populations sont ensuite issues soit d'un précurseur myéloïde soit d'un précurseur lymphoïde (Figure 5). Les cellules de Langerhans, présentes dans les épithéliums de la peau et des muqueuses, et les DC interstitielles du derme dérivent ainsi du précurseur myéloïde $CD11c^+$. Les DC myéloïdes proprement dites peuvent elles se différencier à partir des monocytes $CD14^+$, eux-mêmes dérivés du précurseur myéloïde commun. Les DC plasmacytoïdes (pDC), spécialisées notamment dans la réponse antivirale et la production d'interférons de type I (IFN- α et IFN- β), dérivent elles d'un précurseur lymphoïde $CD11c^-$.

b. Reconnaissance des signaux de danger

Les DC expriment plusieurs types de récepteurs leur permettant de surveiller en permanence les différents tissus de l'organisme et de percevoir la présence de signaux de danger dans l'environnement. Ces PRR (Pattern Recognition Receptors) peuvent être exprimés sur la membrane plasmique ou à l'intérieur des DC, dans le cytoplasme ou insérés dans les membranes des organites ; certains PRR sont aussi libérés sous forme soluble dans le milieu extracellulaire. Les DC sont sensibles à la fois à des motifs moléculaires du « non-soi » dérivés des agents pathogènes (PAMP) et à des signaux de danger endogènes du « soi » altéré (DAMP) dont certains sont listés en partie I.3.

Les récepteur Toll-like (TLR) constituent une famille importante de récepteurs de l'immunité innée, spécialisés dans la reconnaissance de signaux de danger (*Kawai et Akira, 2010*). Il en existe treize chez les mammifères, mais dix seulement sont exprimés par les DC humaines. Ces récepteurs reconnaissent de nombreux motifs moléculaires (acides nucléiques, protéines, glycolipides, ...) caractéristiques de plusieurs familles de pathogènes tels que des bactéries, des virus ou des protozoaires (Figure 6). La majorité des TLR sont exprimés à la surface des DC, mais les TLR 3, 7, 8 et 9 sont eux insérés dans la membrane des phagosomes. Les DC myéloïdes et les pDC présentent des profils d'expression des TLR légèrement différents, les pDC exprimant principalement les TLR 1, 6, 7 et 9 tandis que les DC myéloïdes présentent un profil d'expression plus large avec les TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 et 11.

Les TLR 3, 7, 8 et 9 exprimés au niveau des phagosomes reconnaissent différents types d'acides nucléiques, notamment dérivés des génomes d'origine virale. Le TLR3 permet

ainsi la reconnaissance des ARN bicaténaires, les TLR7 et TLR8 la reconnaissance des ARN simple brin et le TLR9 celle des ADN présentant des îlots CpG non méthylés. Ces ligands d'origine virale sont des activateurs forts de la voie cellulaire de l'immunité par leur capacité à induire, via les TLR spécialisés, la production d'IL-12p70 et d'IFN- α par les DC. Ces TLR joueraient aussi un rôle central dans l'efficacité de la présentation croisée des antigènes exogènes (Jelinek *et al*, 2011 ; de Brito *et al.*, 2011). Dans le cadre de l'immunité anti-tumorale, la présence de ligands capables d'activer spécifiquement ces TLR pourrait notamment permettre d'activer une réponse cellulaire associée à une présentation croisée efficace des antigènes tumoraux.

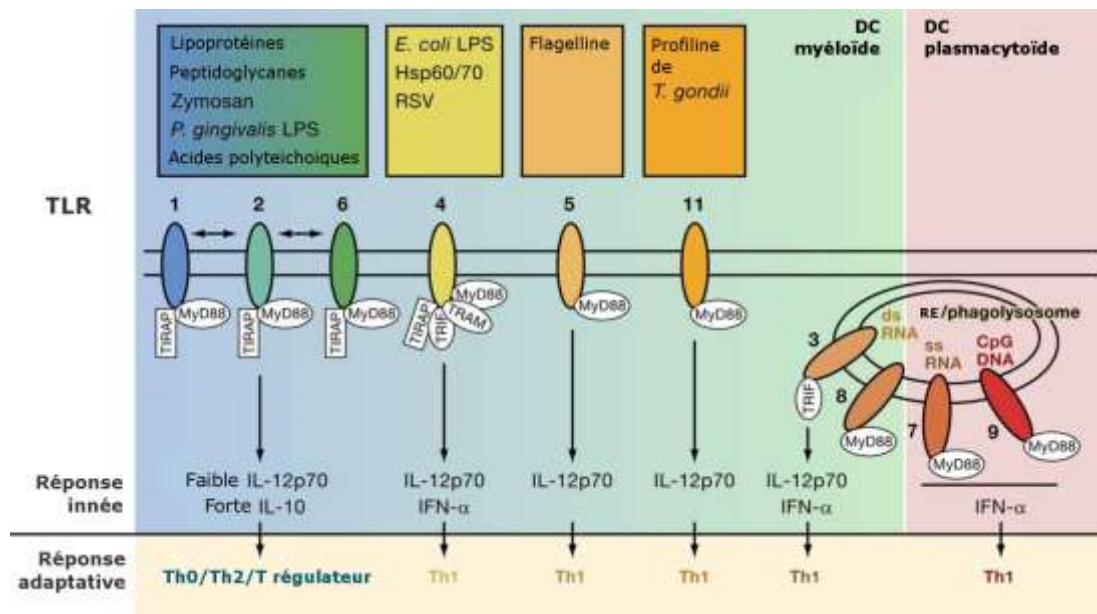


Figure 6 : Récepteurs TLR exprimés par les DC humaines.

Les TLR 1, 2, 4, 5, 6, 11 sont exprimés à la surface alors que les TLR 3, 7, 8, 9 sont insérés dans la membrane de certains organites intracellulaires. Selon les TLR engagés, la DC oriente la réponse immunitaire vers la voie cellulaire (Th1), la voie humorale (Th2) ou la voie tolérogène (T regulatory). (d'après Pulendran *et Ahmed*, 2006)

D'autres molécules permettent la reconnaissance des ARN double brin viraux dans le cytoplasme des DC myéloïdes, selon des voies indépendantes des TLR phagosomaux. Les RIG-I-Like-Receptors (RLR) RIG-I (Retinoic acid-Inducible Gene-I) et MDA-5 (Melanoma Differentiation-Associated gene-5) sont deux RNA hélicases qui induisent la synthèse d'IFN de type I en réponse aux ARN bicaténaires (*Nakhaei et al., 2009*). RIG-I différencie les ARN viraux et les ARN cellulaires par reconnaissance d'une modification des triphosphates en 5' pendant la synthèse virale, une modification non présente sur les ARN cellulaires (*Hornung et al., 2006*) ; RIG-I permet notamment la reconnaissance des acides nucléiques dérivés des paramyxovirus tel que le virus de la rougeole (*Kato et al., 2006*). Les ARN viraux sont aussi reconnus par d'autres senseurs intracellulaires exprimés dans de nombreux types cellulaires (*Hornung et Latz, 2010*) tels que la Protéine Kinase R (*Robertson et Mathews, 1996*), la protéine DAI (DNA-dependent Activator of IFN-regulatory factors) (*Takaoka et al., 2007*) ou l'inflammasome AIM2 (*Rathinam et al., 2010*). Après reconnaissance des ARN double brin, ces molécules induisent la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- α ou l'IL-1 β .

Les NOD-Like Receptors (NLR) reconnaissent eux principalement des motifs bactériens ou des signaux de danger endogènes (acide urique, ATP, ...). Comme décrit ci-dessus (parties I.3.d et I.3.e), les membres de la famille NLR sont impliqués dans la formation des inflammasomes qui induisent l'activation des caspases inflammatoires et la sécrétion de cytokines telles que l'IL-1 β et l'IL-18 (*Martinon et al., 2009*).

c. Phagocytose

Les DC immatures et les autres CPA professionnelles présentes dans les tissus périphériques possèdent de fortes capacités de phagocytose leur permettant de capturer les antigènes présents dans l'environnement. Elles inspectent ainsi en permanence les tissus afin de présenter les antigènes aux effecteurs de l'immunité. Plusieurs types de récepteurs d'internalisation, exprimés à la fois par les DC et par les autres cellules phagocytaires, sont impliqués dans la reconnaissance des agents pathogènes ou des cellules autologues mortes.

Les trois grandes familles de récepteurs d'internalisation sont les C-type Lectine Receptors (CLR), les récepteurs « scavenger » (récepteurs « d'épuration ») et les récepteurs du complément ou des anticorps. Les CLR, subdivisés en quatre sous-familles, reconnaissent des motifs glycosylés via leurs domaines CRD (Carbohydrate Recognition Domain), aussi bien sur des antigènes exogènes que sur des antigènes du soi. Ils permettent l'internalisation

de ces antigènes qui seront ensuite dégradés dans les lysosomes de la CPA puis présentés à sa surface sur les molécules du CMH (*Kerrigan et Brown, 2009*). De nombreux CLR ont été identifiés, dont les molécules DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) exprimée uniquement par les DC (*Svajger et al., 2010*) et le Mannose Receptor. Certains CLR, les collectines, constituent un groupe de récepteurs solubles permettant l'opsonisation d'antigènes et donc l'amélioration de leur internalisation par les CPA.

Les récepteurs « scavenger », ou récepteurs « d'épuration », lient eux principalement des LDL (Low-Density Lipoprotein) oxydées et des ligands polyanioniques (*Murphy et al., 2005*). Les récepteurs scavenger, parmi lesquels CD36, CD68, LOX-1 et SR-A (Scavenger Receptor-A), ont ainsi un rôle prépondérant dans la reconnaissance et l'endocytose des cellules apoptotiques (*Jeannin et al., 2008*). La capacité de LOX-1 à reconnaître la protéine Hsp70 interviendrait par ailleurs de façon favorable pour la présentation croisée des antigènes par les DC (*Delneste et al., 2002*).

Certaines opsonines telles que les pentraxines, les ficolines ou les collectines sont aussi impliqués dans la reconnaissance des cellules mortes. Les collectine MBL (Mannose-Binding Lectin), SP-A (Surfactant Protein-A) et SP-D sont ainsi capables de reconnaître les cellules apoptotiques puis d'être reconnues à leur tour par un complexe calréticuline/CD91 à la surface des cellules phagocytaires (*Vandivier et al., 2002*). Le récepteur au LPS CD14 permet aussi l'endocytose des cellules apoptotiques par reconnaissance d'ICAM-3 (Intercellular Adhesion Molecule-3) sur ces cellules (*Devitt et al., 1998*). A l'inverse, certains signaux exprimés par les cellules viables, tels que CD47, inhibent leur internalisation par les cellules phagocytaires (*Gardai et al., 2006*). La pentraxine PTX3 inhibe par exemple la reconnaissance des cellules apoptotiques par les cellules phagocytaires ; cette molécule serait ainsi impliquée dans le développement de réponses immunitaires contre les antigènes du soi en favorisant la nécrose secondaire des cellules apoptotiques (*Jeannin et al., 2008*).

L'internalisation des antigènes peut se faire selon trois mécanismes principaux : la phagocytose, l'endocytose et la macropinocytose. La phagocytose permet notamment l'ingestion de grandes particules (> 1µm) issues par exemple de cellules mortes ou de pathogènes ; l'endocytose permet l'internalisation d'antigènes via des récepteurs spécifiques (récepteurs aux fragments constants Fc des anticorps, récepteurs scavengers, ...) dans des vésicules de clathrine ou de cavéoline, alors que la macropinocytose permet elle de concentrer des antigènes solubles dans des vésicules intracellulaires (*Trombetta et Mellman, 2005*). Les

antigènes internalisés par ces différents mécanismes sont ensuite adressés vers les endosomes pour y être dégradés.

Les macrophages présentent des capacités de phagocytose plus importantes que les DC. Cependant, les DC sont considérées comme les meilleures CPA, notamment grâce à leur efficacité de présentation des antigènes exogènes. Une des différences majeures entre ces deux types cellulaires résiderait dans la régulation du pH et l'activation des protéases dans leurs compartiments lysosomaux respectifs (*Delamarre et al., 2005*). En effet, il a été montré qu'une acidification excessive des lysosomes diminuait l'efficacité de présentation des antigènes exogènes par les DC (*Savina et al., 2009*). Les macrophages et les neutrophiles, dont le pH intra-lysosomal peut atteindre la valeur de 5, seraient ainsi plutôt spécialisés dans la dégradation des antigènes internalisés, tandis que le pH plus neutre au sein des lysosomes des DC permettrait l'apprêtement et la présentation croisée de ces antigènes sur les molécules du CMH I (*Amigorena et Savina, 2010*).

d. Présentation d'antigènes

Les DC et les autres CPA professionnelles possèdent la capacité de présenter à leur surface à la fois des antigènes endogènes et des antigènes exogènes internalisés. Il existe trois voies différentes de présentation des antigènes. La première est la voie endogène (ou cytosolique) qui permet la présentation des antigènes internes sur les molécules du CMH I ; dans les CPA cette voie est ainsi impliquée dans la présentation des antigènes du soi normal et des antigènes dérivant de pathogènes intracellulaires (virus et certaines bactéries). La voie exogène participe elle à la présentation sur les molécules du CMH II des antigènes internalisés (bactéries, cellules infectées, cellules tumorales, ...). Enfin, la présentation croisée permet le chargement de ces antigènes exogènes sur les molécules du CMH I (*Trombetta et Mellman, 2005*). La voie de présentation croisée est d'ailleurs une caractéristique unique des DC.

Les peptides antigéniques associés aux molécules du CMH I sont reconnus par les lymphocytes T CD8 via leur TCR (T Cell Receptor) et le co-récepteur CD8, alors que les peptides associés au CMH de classe II sont reconnus par les lymphocytes T CD4 via leur TCR et le co-récepteur CD4. La voie de présentation croisée permettant de présenter des antigènes exogènes aux lymphocytes T CD8 cytotoxiques est notamment impliquée dans la réponse cellulaire aux infections virales. Lors des infections aiguës, les IFN de type I interviennent ainsi dans promotion de la présentation croisée des antigènes viraux aux lymphocytes T cytotoxiques par les DC (*Le Bon et al., 2003*). Dans le cadre de

l'immunothérapie anti-tumorale, la voie de présentation croisée présente ainsi un intérêt particulier puisqu'elle permettrait d'activer des effecteurs cellulaires cytotoxiques spécifiques des antigènes exprimés par les cellules tumorales.

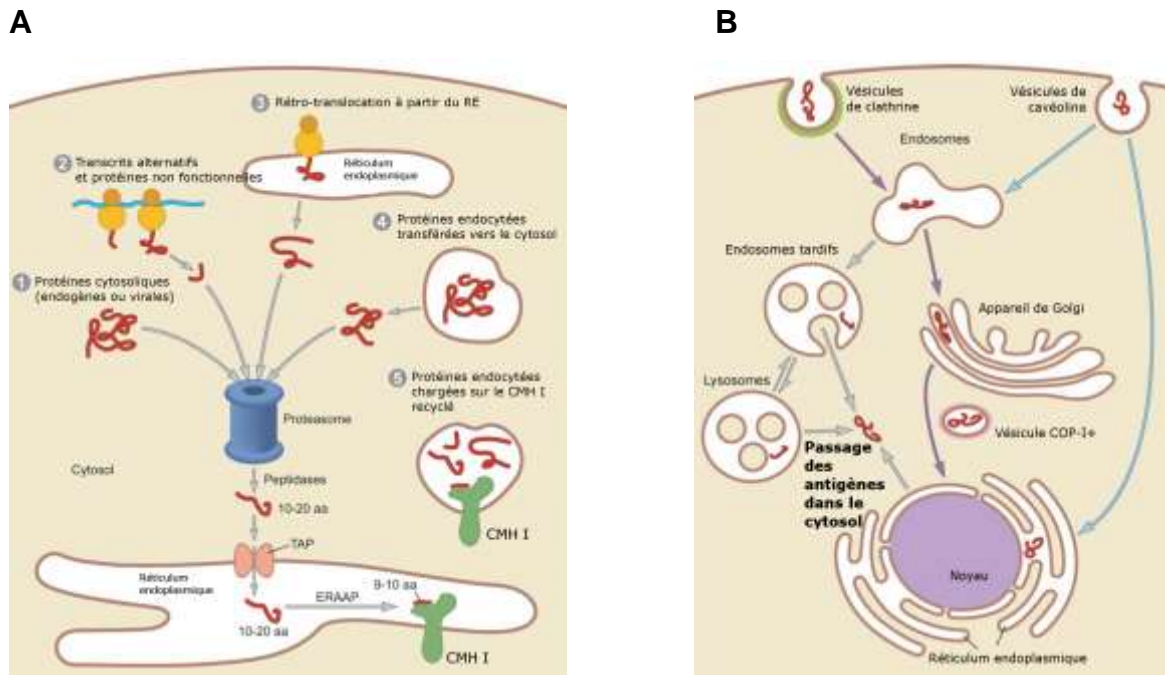


Figure 7 : Présentation des antigènes endogènes et exogènes sur le CMH de classe I

(A) Les peptides antigéniques endogènes dérivent de protéines du cytoplasme (1), de protéines mal conformées (2) ou de protéines issues du réticulum endoplasmique (RE) (3) digérées par le protéasome. Via le transporteur TAP, les peptides sont ensuite relocalisés dans le RE où ils sont chargés sur les molécules du CMH I qui seront adressées vers la surface.

(B) Les antigènes internalisés par les CPA sont adressés vers les endosomes tardifs puis relocalisés dans le cytoplasme selon un mécanisme non identifié. Ils rejoignent ensuite la voie classique de présentation pour être présentés sous forme de peptides sur les molécules du CMH I. (d'après Trombetta et Mellman, 2005)

Avant leur présentation sous forme de peptides sur les molécules du CMH I, les antigènes endogènes doivent tout d'abord être dégradés. Les protéines destinées à la dégradation sont poly-ubiquitinées dans le cytoplasme, après une éventuelle relocalisation dans le cas des protéines issues du RE (*Bacik et al., 1997*). Dans le cytoplasme, ces protéines marquées par des résidus ubiquitine sont prises en charge par un complexe de dégradation, le protéasome, qui digère les antigènes sous forme de peptides (*Sorokin et al., 2009*). Ces peptides sont ensuite pris en charge par le transporteur TAP (Transporter associated with Antigen Processing) inséré dans la membrane du RE. TAP relocalise les peptides vers le RE où ils sont chargés sur les molécules du CMH I. Les molécules du CMH I associées aux peptides antigéniques sont ensuite adressées vers la surface de la CPA via l'appareil de Golgi (Figure 7A). Concernant la présentation croisée (Figure 7B), le mécanisme permettant aux antigènes exogènes de passer des vésicules d'endocytose au cytoplasme pour rejoindre la voie classique de présentation sur le CMH I reste à élucider totalement, même si l'implication de la réponse ERAD (Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation) servant à dégrader les protéines mal conformées a notamment été démontrée (*Ackerman et al., 2006*).

Le chargement des antigènes exogènes sur le CMH de classe II se fait selon un mécanisme différent. Les antigènes exogènes sont internalisés dans des endosomes puis des lysosomes, subissant une acidification croissante qui permet leur dégradation. Les peptides issus de cette dégradation sont ensuite chargés sur les molécules du CMH II. Les protéines du CMH II synthétisés dans le RE transitent par l'appareil de Golgi associés à la molécule CLIP (Class II-associated li-derived Peptide). CLIP permet notamment d'éviter les interactions non spécifiques des molécules du CMH avant le chargement des peptides antigéniques d'origine exogène. Les molécules du CMH II chargées avec les peptides exogènes sont ensuite adressées vers la surface cellulaire.

D'autres molécules apparentées aux molécules du CMH sont impliquées dans la présentation d'autres types d'antigènes. Ainsi, les molécules de la famille CD1 présentent elles des antigènes lipidiques issus de pathogènes ou du soi. La présentation de ces antigènes permet l'activation de lymphocytes T mais aussi de cellules Natural Killer T (*Barral et Brenner, 2007*).

2. Activation de la réponse effectrice

Dans le sang et les tissus périphériques, les DC sont dans un état non activé. Ces DC immatures possèdent de grandes capacités de phagocytose leur permettant de sonder en permanence la composition de l'environnement. Après la reconnaissance de signaux de danger endogènes ou exogènes, ces cellules s'activent et sont alors capables de déclencher une réponse immunitaire. Les DC matures présentent une baisse de leurs capacités de phagocytose et développent la capacité de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires afin de favoriser la rencontre avec les cellules effectrices naïves. La maturation des DC se caractérise aussi par d'autres changements phénotypiques : l'expression de nouveaux marqueurs membranaires et la production de facteurs solubles participent ainsi à l'activation des cellules effectrices de l'immunité adaptatives, notamment les lymphocytes T et les NK.

Comme pour les réponses antivirales, l'induction d'une réponse anti-tumorale par les DC nécessite une médiation cellulaire, c'est-à-dire la génération de lymphocytes T CD8 cytotoxiques (Cytotoxic T Lymphocytes, CTL) capables de reconnaître les antigènes intracellulaires présentés dans le contexte du CMH I, puis de lyser les cellules tumorales. La réponse à médiation cellulaire est liée à une polarisation des lymphocytes T CD4 vers un phénotype T « helper » de type 1 (Th1), le type Th2 étant elle plutôt associé au ciblage des pathogènes extracellulaires (*Knutson et Disis, 2005*). Les CD4 Th1 permettent notamment la prolifération des CTL spécifiques et leur persistance à long terme dans l'organisme.

La polarisation de la réponse CD4 dépend des signaux de danger intégrés par la DC. L'activation des TLR 3, 7, 8 et 9, associés majoritairement à la reconnaissance de signaux d'origine virale, permet une polarisation vers le profil Th1 via la production d'IFN- α et d'IL-12p70 par les DC (*Pulendran et Ahmed, 2006*). Parallèlement, l'activation des TLR3 et TLR9 est impliquée dans la promotion de la présentation croisée des antigènes et dans la différenciation des T CD8 naïfs en CTL (*Datta et al., 2003*).

L'interaction des lymphocytes T naïfs avec la CPA via l'interaction TCR-CMH permet la formation d'une synapse immunologique (Figure 8). Cette synapse se caractérise par de nombreuses interactions moléculaires entre les lymphocytes T et la DC, concentrées au niveau des cSMAC (central Supramolecular Activation Complex) ; ces domaines membranaires regroupent des molécules d'adhésion, de co-stimulation et de présentation antigénique (*Fooksman et al., 2010*). Les trois interactions essentielles à l'activation des lymphocytes T naïfs sont (i) la reconnaissance du complexe CMH-peptide par le TCR, (ii) l'interaction entre les molécules d'adhésion LFA-1 (Lymphocyte Function-associated

Antigen-1) sur le lymphocyte T et ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) sur la CPA et (iii) la liaison des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 avec CD28 sur les lymphocytes T. La liaison de ces molécules de co-stimulation à CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4) présente en revanche une activité inhibitrice pour les lymphocytes T (Lee *et al.*, 1998).

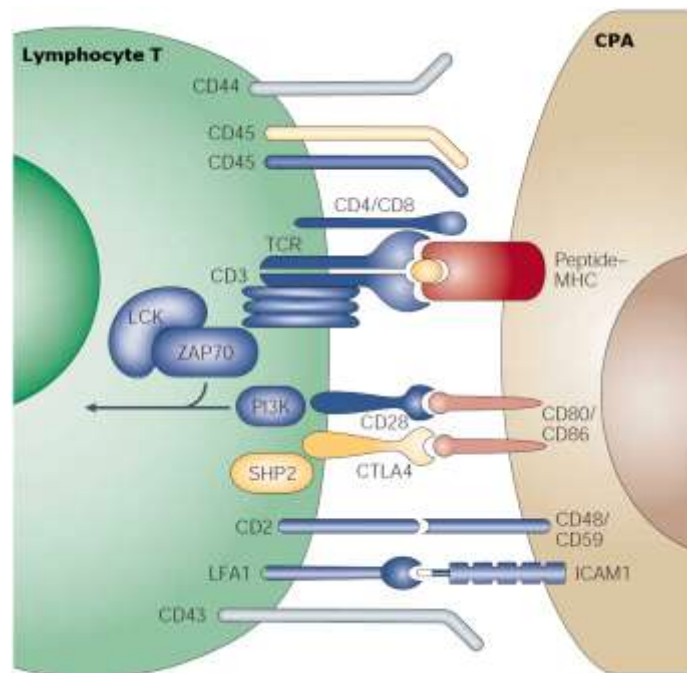


Figure 8 : *Synapse immunologique lors de l'activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques*

Trois interactions majeures interviennent lors de l'activation des lymphocytes T naïfs par les CPA : entre les molécules d'adhésion LFA-1 et ICAM-1, entre le TCR et le complexe CMH-peptide, et entre les molécules de co-stimulation CD80/CD86 et CD28 (signal activateur) ou CTLA-4 (inhibiteur). (d'après Huppa et Davis, 2003)

L'activation des CD8 naïfs en CTL par les CPA requiert l'intervention préalable des lymphocytes T CD4⁺ (Bennett *et al.*, 1997). L'interaction entre la molécule CD40 exprimée

par les CPA et le CD40-ligand (CD40-L) exprimé par les lymphocytes T CD4 activés joue ainsi un rôle central pour « autoriser » la DC (« DC licensing ») à activer une réponse T CD8 cytotoxique (*Bennett et al., 1998*). La reconnaissance de certains signaux de dangers d'origine microbienne, par les TLR ou les autres PRR, peut tout de même permettre aux DC d'activer directement une réponse CTL sans intervention des T CD4 auxiliaires (*Williams et Bevan, 2007*) ; cette activation directe compromet cependant le développement d'une réponse CD8 mémoire à long terme (*Janssen et al., 2003*).

L'IL-12 et l'IFN- α sont aussi fortement impliqués dans la différenciation des CD8 en CTL. La partie p70 de l'IL-12 (IL-12p70) induit notamment la prolifération des CD8 activés (*Curtsinger et al., 1999*), mais soutient aussi leur production d'IFN- γ et leurs fonctions cytotoxiques (*Curtsinger et al., 2003*). Les IFN de type I interviennent eux dans la survie des lymphocytes T (*Marrack et al., 1999*) et leur différenciation en effecteurs cytotoxiques (*Curtsinger et al., 2005*).

Les lymphocytes Natural Killer (NK) sont impliqués dans la reconnaissance et la lyse des cellules infectées par les virus et des cellules tumorales n'exprimant pas le CMH de classe I à leur surface (*Zamai et al., 2007*). Les NK se caractérisent par leur capacité à lyser les cellules cibles sans activation préalable. Ils expriment différents récepteurs inhibiteurs et activateurs dont l'engagement intervient dans le déclenchement de la lyse des cellules cibles. La lyse est inhibée par la liaison des récepteurs KIR (Killer cell Inhibitory Receptor) aux molécules du CMH I (*Döhning et al., 1996*). La reconnaissance des ligands activateurs se fait elle notamment par le récepteur NKG2D ; ce récepteur reconnaît par exemple les ligands MIC (MHC class I Chain-related) et ULBP (UL16-Binding Protein) surexprimés par de nombreuses cellules tumorales (*Groh et al., 1999*).

Outre leurs capacités à activer les cellules de la réponse adaptative, les DC myéloïdes sont aussi capables d'activer les cellules NK de façon directe (*Fernandez et al., 1999*). A l'inverse, les NK participent eux aussi à la maturation des DC et à la promotion de l'immunité à médiation cellulaire (*Gerosa et al., 2002*). Cet échange revêt un intérêt particulier dans le cadre de l'immunité anti-tumorale (*Kalinski et al., 2005*). Il a notamment été décrit que l'IL-12 était impliquée dans l'activation de la prolifération, de l'activité cytotoxique et de la production d'IFN- γ des NK (*Trinchieri et al., 2003*), tandis que la production d'IFN de type I joue un rôle important dans leur activation (*Matikainen et al., 2001*).

3. Immunothérapie anti-tumorale

L'immunothérapie anti-tumorale est une alternative aux thérapies conventionnelles pour le traitement des cancers résistants. Cette stratégie repose sur la reconnaissance, par les cellules et les molécules effectrices du système immunitaire, d'antigènes spécifiques sur les cellules tumorales. On distingue deux types d'immunothérapies : l'immunothérapie passive et l'immunothérapie active.

L'immunothérapie passive consiste à utiliser directement des effecteurs de l'immunité afin de cibler et de détruire les cellules tumorales ; cette stratégie ne vise donc pas à induire le développement d'une réponse anti-tumorale systémique. L'utilisation d'anticorps monoclonaux humanisés a ainsi été développée contre différents types de cancers ; par exemple, des anticorps anti-HER2/neu (Human Epidermal growth factor Receptor 2) sont utilisés pour le traitement de cancers du sein et du poumon (*Vogel et al., 2002*). La fixation de ces anticorps sur les cellules tumorales permet leur reconnaissance par le complément et les cellules de l'immunité exprimant des récepteurs aux fragments Fc des anticorps tels que les NK, par les mécanismes de la CDC (Complement-Dependent Cytotoxicity) ou de l'ADCC (Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity). Des anticorps couplés à des particules radioactives ou à des toxines sont aussi développés afin d'améliorer l'induction de la mort des cellules ciblées (*Sharkey et Goldenberg, 2008*).

L'autre stratégie majeure d'immunothérapie passive consiste en l'utilisation de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques d'antigènes tumoraux. Cette stratégie a notamment été développée dans le cadre du traitement des mélanomes, cette pathologie étant souvent associée à l'infiltration de lymphocytes T spécifiques (Tumor-Infiltrating Lymphocytes, TIL). L'utilisation de TIL, purifiés et amplifiés *ex vivo*, a ainsi été utilisée dans des essais cliniques (*Benlalam et al., 2007*) et a montré des résultats extrêmement encourageants.

L'immunothérapie active vise à activer une réponse anti-tumorale systémique faisant intervenir différents acteurs de l'immunité. Le principe général consiste à délivrer aux CPA un ou plusieurs antigènes tumoraux spécifiques. Cette vaccination doit ensuite permettre l'induction d'une réponse immunitaire contre ces antigènes, voire le développement d'une mémoire immunitaire à long terme afin de protéger le patient de récurrences éventuelles. Les antigènes tumoraux peuvent être délivrés aux CPA sous différentes formes, afin de favoriser leur présentation efficace dans un contexte immunogène : protéines entières, peptides, ARN,

vecteurs d'expression ou encore lysats cellulaires. L'utilisation de lysats de cellules tumorales pouvant être phagocytés par les CPA pourrait notamment favoriser le développement de réponses spécifiques contre différents antigènes en évitant ainsi l'échappement tumoral ; par ailleurs, cette stratégie ne nécessite pas l'identification préalable des antigènes tumoraux ciblés.

Lors des quinze dernières années, de nombreux groupes se sont intéressés à l'utilisation de DC dans le cadre d'essais d'immunothérapie active (*Simon et al., 2009*) ; les DC sont souvent préparées *ex vivo* par chargement avec des antigènes tumoraux ou des cellules tumorales mortes. Cependant, l'efficacité de ces stratégies dépend de nombreux paramètres liés à l'utilisation des DC : le choix de la stratégie d'injection, le mode de chargement et la nature des antigènes tumoraux, l'état d'activation des DC au moment du traitement ou encore la composition du micro-environnement tumoral qui peut participer à l'inhibition de la réponse immunitaire. De plus, les vaccins anti-tumoraux à base de DC sont souvent testés comme dernière ligne de traitement sur des tumeurs agressives, ce qui limite leur efficacité thérapeutique.

Le contexte dans lequel doit se développer la réponse immunitaire anti-tumorale apparaît comme une des clés des stratégies d'immunothérapie. Les thérapies permettant de cibler les cellules tumorales *in situ* peuvent ainsi permettre de créer un environnement favorable à la réponse anti-tumorale en provoquant la libération de signaux de danger par les cellules mortes. L'activité du système immunitaire intervient alors en complément de thérapies ciblées par chimiothérapie, radiothérapie ou virothérapie par exemple.

III. Virothérapie anti-tumorale

1. Principe et généralités

La virothérapie des cancers apparaît depuis peu comme une alternative crédible aux thérapies anti-tumorales conventionnelles. Des observations datant des années 1950 avaient pourtant déjà montré que certains virus présentaient des propriétés oncolytiques (*Moore, 1952*), mais c'est suite à l'amélioration des connaissances sur la biologie des virus et aux progrès majeurs concernant la production des vecteurs viraux pour la thérapie génique que l'utilisation de virus en thérapie anti-tumorale a pu être envisagée sérieusement.

L'utilisation de virus répliquatifs comme traitement anti-tumoral repose sur l'observation que certains virus se répliquent de façon préférentielle dans les cellules tumorales ; à l'inverse, les cellules normales non transformées demeurent elles peu sensibles, voire totalement résistantes à l'infection par ces « virus oncolytiques ». Ces virus exploitent en fait des aberrations cellulaires apparaissant lors de la transformation tumorale ; ces aberrations affectent par exemple l'expression de molécules de surface utilisées comme récepteurs d'entrée ou les mécanismes de la réponse cellulaire antivirale, dont la voie de signalisation impliquant les IFN de type I (*Chiocca, 2002*). Ces mécanismes de défenses demeurent au contraire fonctionnels dans les cellules normales qui restent alors théoriquement résistantes à l'infection.

Les virus oncolytiques sont soit des virus présentant une capacité naturelle à se répliquer préférentiellement dans les cellules tumorales parce qu'ils ont été adaptés à la culture sur ce type de cellules, soit des virus modifiés génétiquement pour disposer de cette propriété. Les modifications génétiques servent en premier lieu à améliorer la spécificité des virus vis-à-vis des cellules tumorales, en ciblant une molécule de surface particulière, en délétant certains gènes viraux nécessaires à la répllication dans les cellules saines, ou en utilisant des promoteurs viraux activables uniquement dans les cellules tumorales (*Lin & Nemunaitis, 2004*). La modification des virus peut aussi servir à optimiser leur cytotoxicité en y insérant des gènes tels que celui codant pour la thymidine-kinase ou la cytosine déaminase, ou à activer une réponse immunitaire en utilisant par exemple des gènes codant pour des cytokines immuno-stimulatrices (IL-4, IL-12, GM-CSF, ...).

2. Principaux virus oncolytiques

a. Virus à ADN

De nombreux virus à ADN sont étudiés pour leurs propriétés oncolytiques. En réalité, les souches sauvages de ces virus infectent la plupart du temps aussi bien les cellules tumorales que les cellules saines. Ces virus à ADN sont donc le plus souvent modifiés dans le but d'acquérir une spécificité envers les cellules tumorales et donc de présenter réellement des propriétés oncolytiques. Certains de ces virus oncolytiques à ADN font l'objet d'essais cliniques avancés. Le seul virus oncolytique actuellement commercialisé est d'ailleurs un adénovirus (ADV), le H101, utilisé en Chine en combinaison avec la radiothérapie pour le traitement de cancers ORL (*Garber, 2006*). Outre les ADV, les herpesvirus (HSV) et les poxvirus sont les autres représentants majeurs des virus à ADN présentant des propriétés oncolytiques.

i. Adénovirus (ADV)

Les ADV sont des virus à ADN double brin linéaire non enveloppés. Plus de 50 sérotypes ont été décrits, la majorité étant impliqués dans des affections respiratoires ou digestives bénignes, pouvant toutefois provoquer des complications chez des patients immunodéprimés (*Kojaoghlanian et al., 2003*). Deux récepteurs sont décrits pour ces virus : le Coxsackie-Adenovirus common Receptor (CAR) (*Bergelson et al., 1997*) et les héparanes sulfate glucosaminoglycanes (*Dehecchi et al., 2001*).

La possibilité de modifier les ADV, notamment en insérant des séquences supplémentaires dans leur génome, explique en grande partie leur large utilisation en thérapies génique et anti-tumorale. Les souches oncolytiques des ADV sont dérivées des ADV de type 5. Ces souches présentent malheureusement une faible spécificité vis-à-vis des cellules malignes en raison de la faible expression du récepteur CAR par les cellules tumorales et de l'expression basale de ce récepteur sur les cellules saines (*Kanerva et Hemminki, 2004*). Cette absence de propriétés oncolytiques naturelles requiert l'amélioration de leur spécificité par des modifications génétiques, notamment pour développer un meilleur ciblage des récepteurs de surface sur les cellules tumorales.

Récemment, plusieurs groupes ont ainsi développé de nouveaux ADV modifiés, capables de cibler des récepteurs spécifiques des cellules tumorales. Deux de ces groupes se sont notamment intéressés au récepteur à l'Epidermal Growth Factor (EGF-R), surexprimé dans plusieurs types de cancers. Le premier de ces ADV oncolytiques cible une forme mutée de l'EGF-R, Delta-EGF-R, exprimé uniquement sur certaines cellules tumorales. Ce virus

cible spécifiquement des cellules humaines de gliome *in vitro*, mais aussi *in vivo* dans un modèle de xénogreffe chez la souris (Piao *et al.*, 2009). Parallèlement, une autre étude rapporte le ciblage de cellules humaines dérivées de cancers ovariens par un ADV complexé au cetuximab, un anticorps monoclonal spécifique de ce même récepteur (Morrison *et al.*, 2009). L'intégrine $\alpha V\beta 6$, surexprimée dans de nombreux carcinomes, est elle aussi une cible potentielle pour ce type de stratégie. L'utilisation d'un ADV dirigé contre cette intégrine permet ainsi de cibler plus efficacement des cellules carcinomateuses *in vivo* par rapport à un ADV équivalent non modifié (Coughlan *et al.*, 2009). De plus, cette efficacité anti-tumorale est associée à une toxicité hépatique réduite par rapport au virus sauvage. L'amélioration des propriétés oncolytiques de ce virus passe alors par une meilleure efficacité d'infection et d'induction de la mort des cellules tumorales, mais aussi par la préservation des cellules saines de l'organisme.

L'ADV ONYX-015 a été largement étudié pour ses propriétés oncolytiques. Ce virus présente un tropisme spécifique pour les cellules tumorales en raison de la délétion du gène *E1B-55K* (Bischoff *et al.*, 1996). La protéine E1B-55K est normalement capable d'interagir avec la protéine suppresseur de tumeur p53 et d'inhiber ainsi son activité pro-apoptotique en promouvant sa destruction (Yew *et Berk*, 1992). Les ADV déficients pour E1B-55K ne seraient donc pas capables de se répliquer dans les cellules exprimant une protéine p53 sauvage, mais seulement dans les cellules présentant une déficience de p53, ce qui est le cas dans de nombreux cancers. L'implication de la déficience en p53 dans les propriétés oncolytiques de l'ONYX-015 a toutefois été remise en question par des travaux plus récents (O'Shea *et al.*, 2004). En effet, la sélectivité du virus vis-à-vis des cellules tumorales serait finalement plutôt dépendante de l'export des ARN viraux tardifs : en l'absence de la protéine E1B-55K, le transport de ces ARN viraux serait ainsi plus efficace dans les cellules tumorales que dans les cellules saines.

En dépit de ces données contradictoires sur le mécanisme impliqué dans le ciblage des cellules tumorales, l'activité oncolytique du virus ONYX-015 a été démontrée dans de nombreuses études cliniques aux Etats-Unis, en particulier contre des cancers ORL, des cancers colorectaux métastatiques et le cancer du pancréas où l'activité anti-tumorale du virus était associée à une non-toxicité du traitement (Wiman, 2006). Cependant, des bénéfices cliniques n'ont réellement été observés que pour une minorité des patients traités, les meilleurs résultats n'étant obtenu qu'en combinaison avec des traitements par chimiothérapie (Yamamoto *et Curiel*, 2010). Pourtant, un des dérivés du virus ONYX-015, le H101, a reçu en

2006 une autorisation de mise sur le marché en Chine pour une utilisation comme traitement anti-tumoral des cancers ORL. Actuellement, il s'agit toujours du seul virus utilisé en clinique dans le cadre d'une thérapie anti-tumorale.

L'insertion d'un promoteur spécifique des cellules malignes dans le génome d'un virus peut aussi permettre son ciblage contre les cellules tumorales (*Toth et al., 2010*). Différents promoteurs peuvent être utilisés afin de diriger le virus contre un tissu, un ou plusieurs types de cancers ou contre les cellules du micro-environnement tumoral (*Nettelbeck, 2008*). Par exemple, le promoteur de la survivine peut être inséré dans les vecteurs adénoviraux afin de contrôler l'expression du gène viral précoce E1A. La survivine est exprimée dans de nombreux cancers et joue un rôle central dans l'inhibition de l'apoptose. Une étude a ainsi montré qu'un ADV-survivine était effectivement capable de lyser spécifiquement des cellules tumorales de différentes origines *in vitro* et d'induire la régression d'ostéosarcomes humains dans un modèle murin (*Kamizono et al., 2005*).

Afin d'obtenir une efficacité thérapeutique, le ciblage spécifique des cellules tumorales doit être associé à une activité lytique efficace du virus. Dans le cadre des virus oncolytiques modifiés génétiquement, la principale stratégie étudiée est l'utilisation de transgènes codant pour des « prodrug convertases » dont la thymidine kinase et la cytosine deaminase (*Schepelmann et Springer, 2006*). Dans les cellules où elles sont exprimées, ces enzymes transforment un agent chimique de sa forme « inerte » à une forme cytotoxique. Elles permettent ainsi, dans le cas des virus oncolytiques, d'éliminer plus efficacement les cellules infectées. Plusieurs études ont ainsi démontré l'efficacité anti-tumorale *in vivo* d'ADV oncolytiques codant pour la thymidine kinase (*Kubo et al., 2010*) ou la cytosine deaminase (*Liu et Deisseroth, 2006*).

L'utilisation de transgènes codant pour des protéines pro-apoptotiques dans des ADV a aussi montré son efficacité. Deux études récentes ont ainsi démontré que des ADV recombinants pour TRAIL (*Zhang et al., 2008*) ou ST13 (*Yang et al., 2008*) étaient capables d'induire l'apoptose de cellules de cancers de l'œsophage ou de cancer colorectal respectivement. TRAIL est connu pour sa fonction dans l'apoptose extrinsèque médiée par les récepteurs, alors que ST13 est une protéine suppresseur de tumeur sous-exprimée dans les tissus tumoraux.

ii. *Herpes virus*

Les herpes simplex virus (HSV) sont des virus enveloppés à ADN double brin linéaire présentant une forte efficacité d'infection, notamment vis-à-vis des cellules neurales et épithéliales. Comme pour les ADV, les HSV oncolytiques, dérivés du HSV-1, doivent être préalablement modifiés afin de présenter des propriétés oncolytiques leur permettant de cibler spécifiquement les cellules tumorales (*Shen et Nemunaitis, 2006*).

Ainsi, différents groupes développent des vecteurs HSV dirigés contre les cellules malignes. Un des exemples les plus récents porte sur l'utilisation d'un vecteur HSV-1 capable de cibler spécifiquement les cellules positives pour HER2/neu (*Menotti et al., 2009*). HER2/neu est une protéine exprimée à la surface des cellules de carcinomes mammaires métastatiques et de carcinomes ovariens et représentant par conséquent une cible privilégiée pour une thérapie anti-tumorale ciblée. Dans cette étude, la protéine d'attachement des virions a été remplacée par une chaîne unique d'un anticorps anti-HER2/neu permettant au virus modifié de présenter des propriétés oncolytiques. L'injection de ce vecteur modifié *in vivo* inhibe ainsi la croissance de tumeurs positives pour HER2/neu.

Les virus HSV-1 possèdent naturellement dans leur génome le gène de la thymidine kinase. Cette enzyme participe normalement à la synthèse de désoxyribonucléotides pour le cycle de réplication virale, mais peut aussi jouer le rôle de « prodrug convertase », comme décrit ci-dessus, en présence par exemple de ganciclovir. Ces substances sont transformées par l'enzyme en métabolites cytotoxiques capable de s'intégrer dans l'ADN des cellules infectées. Depuis plusieurs années, différentes études ont ainsi montré l'efficacité anti-tumorale de virus HSV oncolytiques en combinaison avec du ganciclovir (*Kramm et al., 1996 ; Luo et al., 2007*).

Contrairement aux autres HSV oncolytiques, le HSV HF10 présente spontanément une spécificité envers les cellules tumorales. Le HSV HF10 est ainsi utilisé dans le cadre d'essais cliniques pour le traitement de tumeurs solides en dehors du cerveau, du fait de sa forte neurovirulence (*Nawa et al., 2008*). HF10 a notamment été testé chez des patients présentant des récurrences de cancers du sein (*Kimata et al., 2006*) et chez des patients souffrant de cancers ORL (*Fujimoto et al., 2006*). Ce virus présente une cytotoxicité sélective vis-à-vis de ces cellules tumorales, sans effets secondaires majeurs puisque les cellules normales demeurent elles résistantes à l'infection.

L'utilisation des HSV oncolytiques a aussi été testée en combinaison avec d'autres stratégies anti-tumorales. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs des histone déacétylases (iHDAC)

comme l'acide valproïque (VPA) permet d'augmenter le potentiel oncolytique des HSV (*Otsuki et al., 2008*). La radiothérapie peut elle agir en synergie avec les HSV oncolytiques, ce qui améliore l'activité anti-tumorale des deux stratégies utilisées séparément (*Dai et al., 2010*).

iii. *Poxvirus*

Les poxvirus sont des virus à ADN double brin linéaire. Dans le cadre des études sur les virus oncolytiques, le représentant majeur de cette famille est le virus de la vaccine, déjà testé dans plusieurs études pré-cliniques et cliniques. Les poxvirus ciblent spécifiquement les cellules tumorales en exploitant les déficiences de la voie IFN chez la souris (*Wang et al., 2004*) et l'activation constitutive de certaines voies de signalisation dans les cellules humaines (*Wang et al., 2006a*). Plusieurs souches du virus de la vaccine sont ainsi capables de cibler plus spécifiquement les cellules tumorales que les cellules saines de façon naturelle (*Kirn et Thorne, 2009*). Le virus de la vaccine se réplique plus efficacement dans les cellules humaines présentant une activation constitutive de la voie EGF-R/Ras (*Katsafanas et Moss, 2004*). La délétion de certains gènes viraux nécessaires à l'infection des cellules saines mais dispensables dans les cellules tumorales transformées permet notamment d'accroître le ciblage spécifique des cellules malignes par ce virus. La mort des cellules tumorales induite par le virus de la vaccine présente à la fois les caractéristiques de l'apoptose et de la nécrose.

Comme les ADV et les HSV, les poxvirus peuvent être modifiés pour présenter un meilleur ciblage des cellules tumorales, par délétion de gènes viraux ou par l'ajout de promoteurs spécifiques. Le virus de la vaccine présente aussi l'avantage de pouvoir accueillir des séquences codantes importantes permettant encore d'améliorer son efficacité anti-tumorale. Contrairement à la plupart des autres virus oncolytiques, le virus de la vaccine a déjà montré une certaine efficacité de traitement après une injection systémique. Ainsi, il a été montré que le virus modifié de la vaccine JX-963 permettait d'obtenir une meilleure activité anti-tumorale que l'ADV ONYX-015 *in vitro*, dans des modèles animaux, mais aussi sur des tissus tumoraux humains *ex vivo* (*Thorne et al., 2007*). Un autre virus de la vaccine, le JX-594, a lui démontré une efficacité clinique vis-à-vis de cancers du foie primaires ou métastatiques en essai de phase I, avec des effets secondaires mineurs (*Park et al., 2008*). Ce virus est d'ailleurs actuellement en phase de recrutement pour un essai clinique de phase II.

iv. Parvovirus

Les parvovirus appartenant à la famille des *Parvoviridae* sont des virus à ADN simple brin linéaire capables d'infecter les cellules de mammifères (souris, rat, chien, ...). Ils ciblent les cellules par reconnaissance de l'acide sialique et se répliquent efficacement dans les cellules en division, ce qui leur donne un tropisme particulier pour les cellules tumorales.

Le parvovirus H-1, qui infecte les cellules de rat et qui est non pathogène pour l'Homme, est ainsi connu pour ses propriétés oncolytiques naturelles. De nombreuses études ont démontré sa capacité à induire la mort d'une grande diversité de cellules tumorales humaines (Moehler et al., 2001 ; Herrero y Calle et al., 2004 ; Angelova et al., 2009) sans ciblage des cellules saines. Récemment, le mécanisme d'induction de l'apoptose par le parvovirus H-1 a été en partie élucidé (Hristov et al., 2010). Le virus provoque en fait la formation de ROS à l'intérieur des cellules infectées ; les dommages cellulaires induits par ces ROS déclenchent une apoptose dépendante des caspases 3 et 9. D'autres mécanismes de mort faisant intervenir la cathépsine-B (Di Piazza et al., 2007) ou s'apparentant plus à la nécrose (Ran et al., 1999) avaient déjà été décrits par ailleurs.

b. Virus à ARN

Bien que certains virus oncolytiques à ADN soient déjà testés dans le cadre d'essais cliniques, leur utilisation requiert souvent des modifications génétiques préalables afin d'améliorer leur ciblage spécifique des cellules tumorales et leurs capacités à lyser efficacement les cellules infectées. De nombreux virus à ARN présentent eux aussi des propriétés oncolytiques (Russell, 2002). Très souvent, ces virus sont d'ailleurs capables de cibler plus spécifiquement les cellules tumorales de façon naturelle, c'est-à-dire sans nécessiter de modifications complexes.

i. Virus de la Maladie de Newcastle – Newcastle Disease Virus

L'activité oncolytique du Newcastle Disease Virus (NDV) a été démontrée contre plusieurs types de tumeurs humaines lors de ces deux dernières décennies (Lorence et al., 1994 ; Phuangsab et al., 2001). Le NDV est un virus enveloppé à ARN simple brin de la famille des paramyxovirus, non pathogène pour l'Homme. Récemment, le mécanisme de sa spécificité oncolytique naturelle a été décrit (Elankumaran et al., 2006) : le NDV induit ainsi la mort des cellules tumorales infectées en déclenchant l'apoptose par différentes voies dépendantes des caspases 3, 8 et 9.

Différentes souches atténuées du NDV présentant des propriétés oncolytiques naturelles ont été utilisées dans le cadre d'essais cliniques. Ces essais ont apporté des résultats encourageants qui permettent d'envisager son utilisation en thérapie anti-tumorale. La souche atténuée PV701 a ainsi été testée en phase I sur différents cancers solides (*Lorence et al., 2007*). Des cas d'éradication partielle ou totale des tumeurs sont rapportés, associés à des effets secondaires mineurs tels que des états grippaux ou une réaction inflammatoire au site d'injection. De nouvelles stratégies d'injection (*Laurie et al., 2006 ; Hotte et al., 2007*) permettraient d'ailleurs d'éviter ces effets secondaires. Après trois essais cliniques de phase I incluant au total 114 patients, la souche PV701 du NDV est actuellement testée en essai clinique de phase II.

Le virus lentogénique NDV-HUJ dérivé du NDV présente aussi un potentiel oncolytique intéressant. Dans un essai de phase I/II publié en 2006, ce virus démontre une efficacité anti-tumorale chez des patients atteints de glioblastome multiforme (*Freeman et al., 2006*), un cancer non testé préalablement avec le virus PV701. Dans cette étude, 1 patient sur 11 a notamment montré une réponse clinique complète. Le nombre de cancers cibles des souches oncolytiques du NDV ne cesse de croître, comme le montrent deux études récentes sur le cancer du poumon (*Yaacov et al., 2008*) et le mésothéliome pleural malin (*Silberhumer et al., 2010*). Ces résultats sont des arguments supplémentaires pour le développement de l'utilisation du NDV en thérapie anti-tumorale.

ii. *Virus de la Stomatite Vésiculaire – Vesicular Stomatitis Virus*

Le Vesicular Stomatitis Virus (VSV) est un virus enveloppé à ARN, largement étudié pour son potentiel oncolytique contre différents types de tumeurs (*Barber, 2004*). Ce virus étant très sensible à la réponse IFN, il a d'abord été utilisé contre des cellules tumorales présentant une déficience au niveau de cette réponse antivirale (*Lichty et al., 2004*). Cependant, la spécificité du VSV envers les cellules tumorales ne se limiterait pas à l'exploitation de déficiences dans la voie IFN. D'autres études ont ainsi décrit que l'inactivation de p53 serait un mécanisme alternatif participant à la spécificité tumorale du VSV (*Balachandran et al., 2001*).

Le récepteur d'entrée du VSV reste toujours non identifié. Une étude a récemment montré qu'une souche de ce virus était internalisée de façon plus efficace par des cellules de gliome que par des astrocytes sains (*Ozduman et al., 2008*). Ces résultats permettent d'envisager un ciblage extracellulaire spécifique via une molécule de surface, en plus de la sélectivité de la réplication du VSV dans les cellules transformées.

Il est aussi intéressant de noter que la protéine de matrice MP du VSV présente une activité anti-tumorale intrinsèque. Il a ainsi été démontré que cette protéine était impliquée dans l'induction de l'apoptose de cellules primaires ou métastatiques de cancer du sein, sans intervention des autres composants du VSV (*Shi et al., 2009*). L'utilisation de virus oncolytiques « vivants » lève souvent des problèmes de sécurité sanitaire ; la possibilité d'utiliser une protéine virale unique offre donc une alternative intéressante. Ainsi, l'intégration de cette protéine dans d'autres vecteurs viraux atténués pourrait notamment être envisagée pour une application clinique.

iii. Réovirus

Les réovirus sont des virus à ARN double brin segmenté qui ne sont impliqués que lors d'affections bénignes telles que des fièvres. Les réovirus apparaissent comme des agents oncolytiques prometteurs puisqu'ils infectent préférentiellement les cellules tumorales présentant une activation constitutive de la voie Ras. Cette activation induit l'inhibition de la Protéine Kinase dépendante de l'ARN bicaténaire (PKR) par un inhibiteur protéique endogène (*Mundschau et Faller, 1994*). L'activité oncolytique des réovirus a été démontrée contre de nombreux types de cancers, dont les cancers du sein (*Norman et al., 2002*), les lymphomes (*Alain et al., 2002*) et les cancers ovariens ou colorectaux (*Hirasawa et al., 2002*). Plus récemment, l'infection et la destruction de cellules souches tumorales mammaires par un réovirus oncolytique a aussi été démontrée (*Marcato et al., 2009*).

Dans le cadre de plusieurs études cliniques, les réovirus sont utilisés en combinaison avec d'autres types de traitements anti-tumoraux, notamment la chimiothérapie. Il a ainsi été montré que la souche « Reovirus type 3 Dearing », aussi connue sous le nom de Reolysin®, agissait de façon synergique avec le cisplatine contre des mélanomes murins et humains (*Pandha et al., 2009*), et avec le cisplatine, la gemcitabine, la vinblastine ou le paclitaxel contre des cellules humaines de carcinome du poumon « non à petites cellules » (*Sei et al., 2009*). Plusieurs études cliniques de phase I et II sont d'ailleurs en cours pour évaluer le potentiel de la Reolysin®. Les résultats de deux de ces études ont été publiés récemment : l'une menée chez des patients souffrant de cancers à stades avancés a montré l'absence de toxicité sévère du traitement (*Vidal et al., 2008*), tandis que dans la deuxième les auteurs décrivent 45% de bénéfice clinique chez des patients atteints de cancers solides à des stades avancés (*Gollamudi et al., 2010*).

iv. Autres virus oncolytiques à ARN

D'autres virus à ARN présentent un potentiel oncolytique intéressant (*Russell, 2002*). C'est par exemple le cas de souches atténuées du virus des oreillons (*Myers et al., 2005*) ou de certains poliovirus (*Dobrikova et al., 2008*) dont les propriétés anti-tumorales spécifiques semblent comparables aux autres virus à ARN décrits ci-dessus. Certains groupes ont aussi développé des virus Influenza présentant des propriétés anti-tumorales. Ces virus ne présentent pas d'activité oncolytique naturelle mais la mutation du facteur de virulence NS1, qui bloque normalement la réponse IFN des cellules infectées, permet à ces virus de se répliquer dans les cellules tumorales mais pas dans les cellules saines (*Bergmann et al., 2001 ; Efferson et al., 2006*).

3. Virus de la Rougeole

a. Souches sauvage et vaccinales

i. Pathologie et vaccination

Le virus de la rougeole (Measles Virus, MV) est un virus enveloppé de la famille des Paramyxovirus, genre *Morbillivirus*. Son génome est constitué d'un ARN simple brin négatif non segmenté contenu dans une capsidie de forme hélicoïdale. Le virus MV est extrêmement infectieux, la contagion interhumaine se faisant principalement par les aérosols d'origine respiratoire. La rougeole est une maladie qui se caractérise par une forte fièvre, de la toux et des éruptions cutanées sous forme de petites plaques rouges. Elle est souvent considérée comme bénigne mais des complications importantes peuvent apparaître, telles que des cécités dues à des affections de la cornée ou des encéphalites pouvant mener à la mort des personnes infectées.

L'isolation de la souche Edmonston en 1954 (*Enders et Peebles, 1954*) a permis de dériver deux souches atténuées du virus MV : Edmonston A et Edmonston B (Figure 9). Par la suite, d'autres souches plus atténuées ont pu être dérivées de ces virus, dont la souche Schwarz/Moraten (*Schwarz, 1962*). Depuis 1975, cette souche est la plus largement utilisée comme vaccin, l'administration de la souche Edmonston B utilisée jusqu'alors provoquant souvent une fièvre trop importante (*Krugman et al., 1962*). La souche Schwarz présente de nombreux avantages qui justifient son usage dans le cadre de la vaccination de jeunes enfants ; elle induit notamment des réponses immunitaires cellulaires et humorales à long terme et présente une stabilité génétique importante puisqu'aucune réversion vers une forme pathogène n'a jamais été observée (*Combredet et al., 2003*).

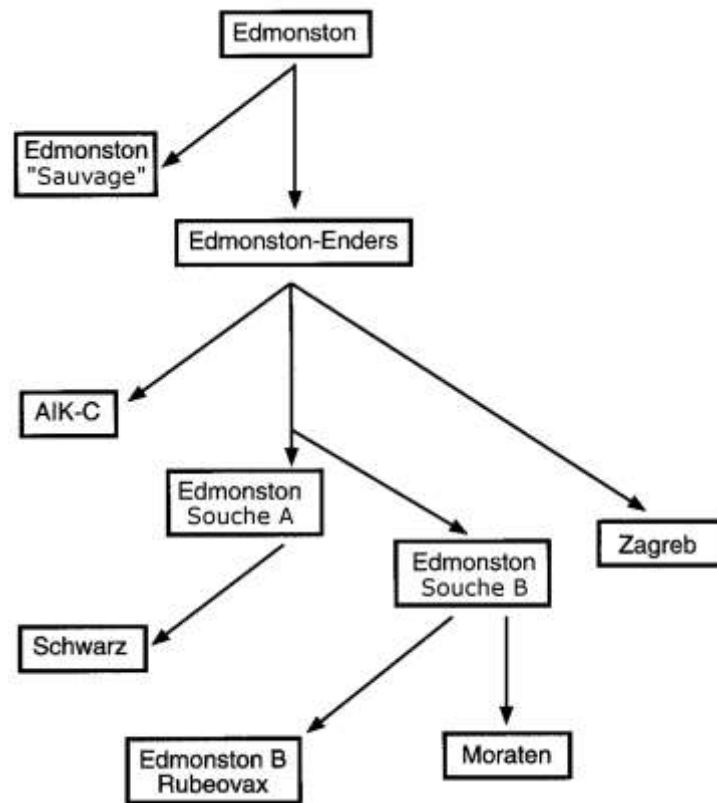


Figure 9 : Souches vaccinales du virus MV dérivées de la souche Edmonston.

Plusieurs souches atténuées du virus MV ont été dérivées de la souche Edmonston-Enders isolée en 1954. La souche vaccinale la plus utilisée est maintenant la souche Schwarz dont l'homologie parfaite avec la souche Moraten a depuis été démontrée. (d'après Parks et al., 2001)

L'analyse génétique des différentes souches vaccinales dérivées de la souche sauvage Edmonston a montré que les souches Schwarz et Moraten, pourtant obtenues séparément, sont en fait parfaitement identiques (Parks et al., 2001). Cette homologie de séquence peut notamment s'expliquer par le fait que ces deux souches aient toutes les deux été obtenues par culture sur des fibroblastes embryonnaires de poulet, orientant ainsi la sélection de ces souches particulières. Le génome de ces deux souches diffère de celui de la souche sauvage Edmonston d'environ 0,3%. Les substitutions de bases sont retrouvées aussi bien dans des régions codantes des différentes protéines virales que dans certaines régions non-codantes. Le caractère atténué de la souche Schwarz/Moraten chez l'Homme s'explique notamment par

leur adaptation aux cellules animales utilisées pour leur production : le virus se réplique de façon moins efficace dans les cellules humaines, permettant l'induction d'une immunité efficace qui éliminera l'infection avant que de nouvelles mutations ne permettent au virus d'améliorer l'infection des cellules humaines.

Depuis la fin des années 1960, plusieurs milliards de personnes ont été vaccinées contre la rougeole. Les campagnes de vaccination généralisée ont ainsi permis de diminuer de façon drastique le nombre de morts dues à l'infection par le virus MV, dans les pays développés mais aussi depuis le début des années 2000 dans les pays en voie de développement (*Wolfson et al., 2007*). Cependant, la recrudescence des cas de rougeole lors de ces cinq dernières années dans les pays occidentaux, et notamment en France, atteste d'une couverture vaccinale encore insuffisante résultant en partie des réticences de certaines populations vis-à-vis de la vaccination anti-infectieuse (*Parent du Châtelet et al., 2010*).

ii. Récepteurs et tropisme

La souche sauvage du virus MV utilise comme récepteur d'entrée la molécule SLAM (Signaling Lymphocyte-Activation Molecule), aussi appelée CD150 (*Tatsuo et al., 2000*). CD150/SLAM est exprimée par les thymocytes immatures mais principalement par certaines cellules immunitaires activées telles que les DC, les monocytes/macrophages et certaines populations de lymphocytes T et B (*Schwartzberg et al., 2009*). La souche sauvage du virus MV présente un tropisme particulier pour ces cellules dans lesquelles il prolifère activement. Ces cellules seraient par ailleurs impliquées dans la propagation du virus dans l'organisme.

Les souches atténuées dérivées de la souche Edmonston utilisent elles deux récepteurs d'entrée distincts et présentent donc un tropisme différent. Ces souches ont conservé la capacité de cibler la molécule CD150/SLAM mais elles sont aussi capables d'utiliser la molécule CD46 comme récepteur d'entrée (*Naniche et al., 1993 ; Dhiman et al., 2004*). CD46, aussi connue sous le nom de Membrane Cofactor Protein (MCP), a d'abord été identifiée comme une protéine membranaire de régulation de complément (mCRP) exprimée à un niveau basal par toutes les cellules de l'organisme (*Liszewski et al., 1991*). CD46 protège ainsi les cellules des attaques de ce système de défense inné en participant à l'inactivation des composants C3b et C4b du complément grâce à ses quatre domaines CCP (Complement Control Protein repeat) aussi nommés SCR (Short Consensus Repeats) (*Iwata et al., 1995*).

L'interaction de l'hémagglutinine H du virus MV avec la molécule CD46 se fait par reconnaissance des domaines CCP-1 et CCP-2 (Figure 10). Cette fixation du virus MV

engage le récepteur et induit l'activation d'une voie de signalisation en aval via son domaine cytoplasmique. Cette voie de signalisation serait notamment impliquée dans l'immunosuppression induite par le virus en provoquant par exemple la baisse de production d'IL-12p70 par les monocytes humains (Karp *et al.*, 1996). La ligation du récepteur CD46 par différents ligands est d'ailleurs aussi impliquée dans la polarisation de lymphocytes T CD4⁺ humains vers un phénotype régulateur Tr1 (Kemper *et al.*, 2003).

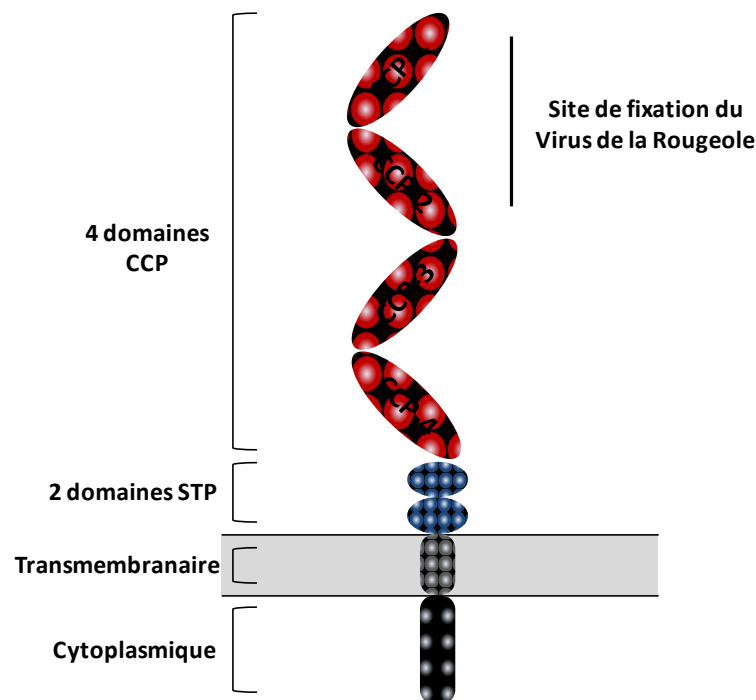


Figure 10 : Structure du récepteur CD46

La partie extracellulaire de CD46 se compose de 4 domaines CCP (Complement Control Protein repeat) impliqués dans l'inhibition de l'activité du complément. La reconnaissance de CD46 par l'hémagglutinine du virus MV se fait elle au niveau des domaines CCP-1 et CCP-2. L'extrémité cytoplasmique du récepteur permet d'activer des voies de signalisation intracellulaires en réponse à la ligation du récepteur par différents ligands (complément, virus MV, ...). (d'après Riley *et al.*, 2002)

La molécule CD46 intervient dans de nombreux processus physiologiques (Riley-Vargas *et al.*, 2004). Ce récepteur est ainsi impliqué dans le processus de fertilisation en participant à l'entrée du spermatozoïde dans l'ovocyte. Outre le virus MV, CD46 peut aussi être reconnu par d'autres types de pathogènes dont l'herpesvirus HSV-6, certains sérotypes d'adénovirus, *Streptococcus pyogenes* et *Neisseria* (Cattaneo, 2004).

Le virus MV sauvage présente un tropisme pour les cellules neurales, épithéliales et endothéliales, alors que ces cellules n'expriment pas CD150/SLAM. Les différences entre le profil d'infection et le profil d'expression des récepteurs connus pour ce virus suggèrent que d'autres molécules seraient impliquées dans l'infection par le virus MV et plaident notamment pour l'existence d'un récepteur « épithélial » (epithelial cell Receptor, epR) encore non identifié. Certains travaux rapportent ainsi l'infection de cellules selon un mécanisme indépendant à la fois de CD150/SLAM et de CD46 (Takeda *et al.*, 2007).

iii. Protéines virales et cycle répliatif

Le génome du virus MV mesure environ 16 kilobases. Il code pour huit protéines (Figure 11) : une nucléoprotéine structurale (N) capable de lier l'ARN viral, une phosphoprotéine (P) intervenant lors de la réplication et de l'expression du génome viral, le facteur de virulence V qui inhibe la réponse aux interférons de type I, la protéine C qui participerait à l'assemblage des particules virales, une protéine de matrice (M) localisée sur la face intérieure de l'enveloppe et permettant de structurer les virions, une hémagglutinine (H) impliquée dans la reconnaissance des récepteurs d'entrée, une protéine de fusion (F) qui permet la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane des cellules cibles et enfin une polymérase (L pour Large protein) participant à la réplication et à la transcription de l'ARN génomique viral (Bellini *et al.*, 1994 ; Hilleman, 2002 ; Yanagi *et al.*, 2006).



Figure 11 : Génome du virus de la rougeole

Le génome du virus MV est un ARN négatif codant pour huit protéines N, P, V, C, M, F, H et L. Le gène P est un gène polycistronique qui code pour les 3 protéines P, V et C. (d'après Hilleman, 2002)

L'enveloppe du virus MV est constituée des protéines H, F et M associées à une double membrane lipidique d'origine cellulaire (Figure 12). Après reconnaissance des récepteurs cellulaires CD46 ou SLAM par l'hémagglutinine H du virus, le changement de conformation des protéines d'enveloppe permet à la protéine F d'induire la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique de la cellule cible (Smith *et al.*, 2009).

L'ARN viral à polarité négative est associé aux protéines de la nucléocapside P, N et L. Ces protéines forment par ailleurs le complexe de la polymérase virale dépendante de l'ARN, la protéine L constituant la partie catalytique de l'enzyme. Cette polymérase intervient lors de la transcription du génome viral sous forme d'ARN messagers qui servent à synthétiser les nouvelles protéines virales (Figure 13). La réplication du génome viral passe par la synthèse d'ARN positifs « pleine longueur » qui seront transcrits en ARN génomiques négatifs, associés aux protéines de la nucléocapside, puis adressés vers la membrane pour former les nouvelles particules virales capables d'infecter de nouvelles cellules cibles.

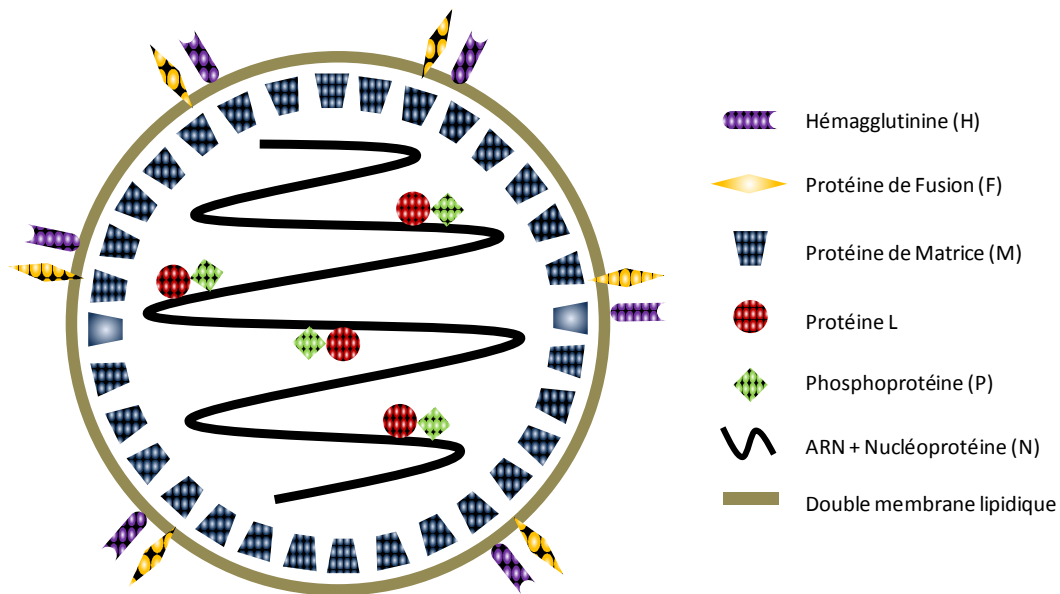


Figure 12 : Structure du virus de la rougeole

Le virus de la rougeole est un virus enveloppé à ARN simple brin négatif. L'ARN viral est protégé par la nucléocapside formée des protéines N, P et L. L'enveloppe est composée de la protéine de matrice M, d'une double membrane lipidique issue des cellules hôtes ainsi que de la protéine de fusion F et de l'hémagglutinine H qui permet la reconnaissance des récepteurs d'entrée sur les cellules cibles. (d'après Moss et Griffin, 2006)

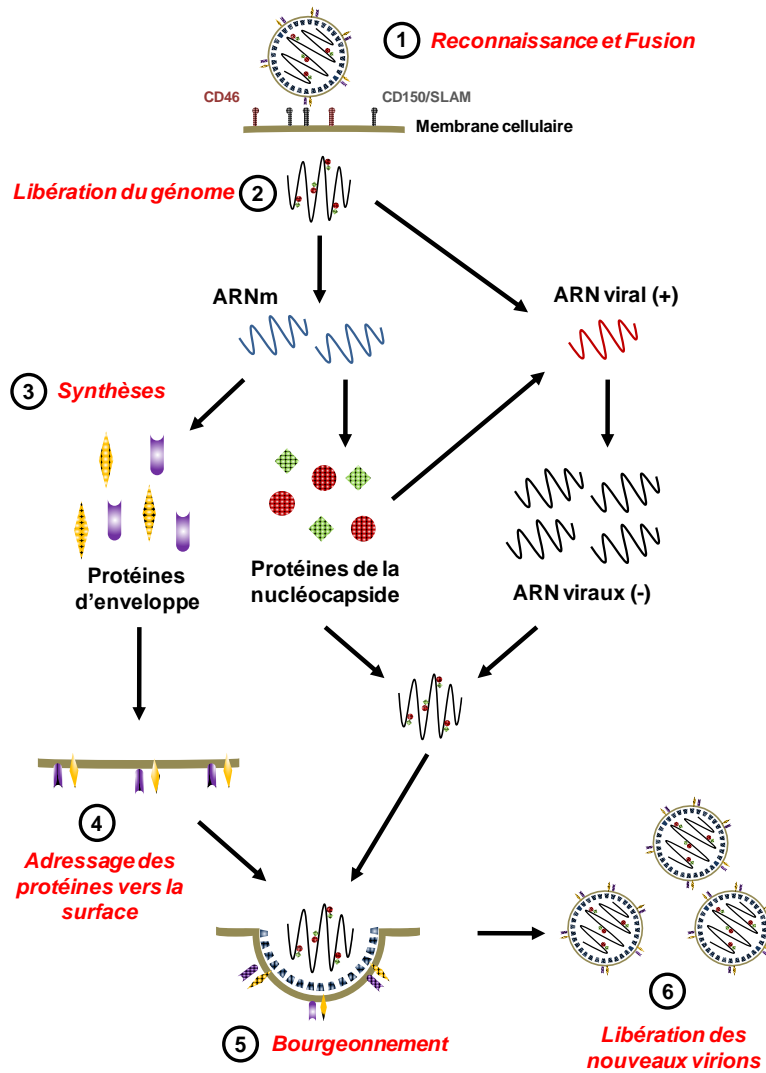


Figure 13 : Cycle répliatif du virus de la rougeole

L'hémagglutinine H reconnaît les récepteurs cellulaires CD46 ou CD150/SLAM. La protéine de fusion F induit ensuite la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule cible (1). Le génome viral est libéré dans le cytoplasme (2) puis transcrit, par la polymérase virale formée des protéines N, P et L, sous forme d'ARN messagers (ARNm) afin de synthétiser les différentes protéines virales (3). Le génome viral est aussi transcrit sur toute sa longueur en ARN viraux à polarité positive (+) qui permettent ensuite la production de génomes viraux ARN (-). Les protéines de la nucléocapside néo-synthétisées se complexent à ces ARN viraux puis sont adressées vers la surface cellulaire conjointement aux protéines d'enveloppe (4) où la protéine de matrice M aide à l'incorporation de la nucléocapside dans les virions. Ces nouveaux virions bourgeonnent à la surface de la cellule hôte (5) et sont libérés dans le milieu extracellulaire ou fusionnent avec les cellules voisines (6). (d'après Moss et Griffin, 2006)

iv. Effets cytopathiques

La réplication du virus MV se caractérise par la formation d'inclusions dans le cytoplasme des cellules infectées (Bellini *et al.*, 1994). Ces inclusions résultent notamment de l'accumulation d'ARN et de protéines virales dans certaines zones de la cellule. Cependant, l'effet cytopathique majeur de l'infection par le virus MV reste la formation de cellules géantes multinucléées, aussi appelées syncytia.

La formation de ces syncytia se fait par la fusion d'une cellule infectée avec les cellules voisines. Ces fusions impliquent souvent plusieurs dizaines de cellules et il n'est par conséquent pas rare d'observer une centaine de noyaux regroupés dans un seul et même syncytium. L'implication des récepteurs d'entrée CD150/SLAM (Erlenhöfer *et al.*, 2002) et CD46 (Anderson *et al.*, 2004) a été démontrée pour la formation de ces syncytia par différentes souches de MV. Pourtant, d'autres travaux ont montré que les syncytia pouvaient aussi se former par des mécanismes indépendants de CD150/SLAM et de CD46 (Takeda *et al.*, 2007), donnant ainsi des arguments supplémentaires en faveur de l'existence d'un ou plusieurs récepteurs d'entrée alternatifs.

Les fusions intercellulaires induites par le virus MV permettent la propagation de l'infection mais aussi le recrutement de machineries cellulaires supplémentaires permettant une production plus efficace des nouveaux virus (Anderson *et al.*, 2004). Cependant, la formation des syncytia provoque finalement la mort des cellules infectées par apoptose avec une fragmentation de l'ADN cellulaire (Esolen *et al.*, 1995 ; Galanis *et al.*, 2001). D'autres études ont cependant montré que les protéines du virus MV pouvaient aussi induire la mort cellulaire par un processus non-apoptotique après la formation des syncytia (Bateman *et al.*, 2000).

b. Utilisation du virus de la rougeole en virothérapie anti-tumorale

i. Surexpression de CD46

La molécule CD150/SLAM n'est exprimée que par certains types cellulaires, tandis que la protéine CD46 est elle exprimée à un niveau basal de façon ubiquitaire dans l'organisme. Il a cependant été décrit que CD46 était aussi surexprimée dans de nombreux cancers (Fishelson *et al.*, 2003). En effet, cette protéine permet de protéger les cellules contre les attaques du complément ; sa surexpression confère par conséquent un avantage sélectif aux cellules tumorales qui l'expriment fortement (Gancz *et al.*, 2009). D'autres mCRP comme

CD55 ou CD59 peuvent d'ailleurs aussi être surexprimées par les cellules tumorales, parfois de façon conjointe à CD46.

La surexpression des mCRP a été mise en évidence dans quasiment tous les types de cancers. De fortes surexpressions de CD46 ont notamment été montrées dans les carcinomes du sein, du côlon (*Thorsteinsson et al., 1998*) ou de l'ovaire (*Bjørje et al., 1998*), ou dans certaines leucémies (*Seya et al., 1990*). Pour un type de tumeur donné, la surexpression des mCRP à la surface des cellules tumorales n'est pas constante ; elle dépend notamment de facteurs tels que le TNF- α , l'IL-1 β ou l'IL-6, mais aussi de l'existence ou non d'une pression sélective déterminée par l'exposition préalable des cellules tumorales à des attaques du complément (*Fishelson et al., 2003*).

ii. Etudes précliniques et cliniques

La surexpression des mCRP, dont CD46, par les cellules tumorales est souvent considérée comme un obstacle majeur aux stratégies d'immunothérapie anti-tumorale puisqu'elle interfère avec les mécanismes de la CDC (Complement-Dependent Cytotoxicity) et de l'opsonisation. Pourtant, la surexpression de CD46 par les cellules tumorales les rend en contrepartie plus susceptibles à l'infection par les souches vaccinales atténuées du virus MV que les cellules saines.

Ainsi, de nombreuses études précliniques ont montré que les souches atténuées du virus MV capables de cibler CD46 présentent effectivement une forte spécificité envers une grande variété de cellules tumorales humaines, alors que les cellules saines issues des mêmes tissus restent elles peu ou pas sensibles à l'infection. L'activité oncolytique du virus MV a été démontrée *in vitro* et dans des modèles de xénogreffes de cellules tumorales humaines chez des souris immunodéficientes contre des cellules de lymphome (*Grote et al., 2001*), de myélome multiple (*Peng et al., 2001*), de glioblastome multiforme (*Phuong et al., 2003*), de carcinomes de l'ovaire (*Peng et al., 2002*) et du sein (*McDonald et al., 2006*), de mésothéliome (*Gauvrit et al., 2008*) ou de cancer de la prostate (*Msaouel et al., 2009*).

Un essai clinique de phase I sur 21 patientes souffrant de récurrences de carcinomes ovariens a par ailleurs récemment montré des résultats extrêmement intéressants (*Galanis et al., 2010*). Après injection intra-péritonéale du virus, aucun effet secondaire majeur n'a été observé : pas de toxicité à la dose maximale d'injection, pas d'immunosuppression liée au traitement ni de production d'anticorps dirigés contre le virus et pas de présence de virus dans la salive ou les urines. Une stabilisation de la maladie a été mise en évidence chez 14 des 21 patientes, avec un allongement de la médiane de survie de 6 à 12 mois. Les résultats des

études précliniques sur les différents types de cancers et ceux obtenus dans le cadre de l'essai clinique sur le cancer de l'ovaire font ainsi apparaître l'utilisation des virus MV oncolytiques comme une alternative crédible aux stratégies anti-tumorales conventionnelles.

4. Virothérapie anti-tumorale et système immunitaire

L'influence du système immunitaire sur l'efficacité ou sur l'échec de la virothérapie anti-tumorale demeure controversée (*Boisgerault et al., 2010, voir en Annexes*). En effet, l'impact négatif de l'immunité antivirale sur l'activité anti-tumorale des virus oncolytiques a été noté dans plusieurs études ; les anticorps ou les cellules phagocytaires sont notamment capables d'inhiber de façon importante à la fois la propagation de ces virus dans l'organisme mais aussi leurs capacités à infecter les cellules tumorales.

A l'inverse, d'autres travaux ont pour leur part montré que le système immunitaire pouvait aussi agir en synergie avec les virus oncolytiques, les effets anti-tumoraux étant de façon générale plus importants dans les animaux immunocompétents. Les travaux actuels visent donc à définir l'impact réel du système immunitaire sur l'efficacité de la virothérapie anti-tumorale afin d'améliorer son développement en tant que stratégie thérapeutique alternative.

a. Rôle inhibiteur du système immunitaire

i. Elimination des virus oncolytiques

Différents mécanismes de l'immunité participent à l'inhibition de l'activité des virus oncolytiques, notamment dans les cas où ces virus sont injectés de façon systémique *in vivo* (Figure 14). Pour certains virus oncolytiques, il a été observé que leur efficacité anti-tumorale était moindre dans des modèles animaux immunocompétents ; l'inhibition des différents composants de la réponse immunitaire antivirale participe alors à augmenter l'efficacité de ces stratégies (*Ikeda et al., 1999*).

La réponse IFN est le premier mécanisme de l'immunité innée capable de restreindre la réplication de ces virus (*Ahtiainen et al., 2010*), puisque les propriétés oncolytiques de certains dépendent en partie de l'inactivation de cette réponse antivirale dans les cellules tumorales. La présence d'anticorps neutralisants dans la circulation sanguine est une autre limite majeure des traitements par virus oncolytiques. L'utilisation de virus contre lesquels ont été développées des stratégies de vaccination efficaces, tels que les virus de la vaccine ou de la rougeole, se heurte ainsi à l'existence d'une mémoire immunitaire efficace et à la

présence d'anticorps neutralisants dans le sérum des patients (Amanna *et al.*, 2006). La majorité des individus présente aussi des immunités pré-existantes contre certains virus tels que les ADV (Bessis *et al.*, 2004). De façon générale, la majorité des études ont montré que l'injection systémique de virus oncolytiques « nus » présentait une efficacité trop faible pour pouvoir envisager des traitements anti-tumoraux par cette voie.

Il est tout de même intéressant de noter que plusieurs études rapportent que la présence d'anticorps neutralisants dans la circulation sanguine ne restreint pas automatiquement l'activité des virus oncolytiques, que ce soit pour le virus MV (Grote *et al.*, 2001), les HSV ou le NDV (Parato *et al.*, 2005).

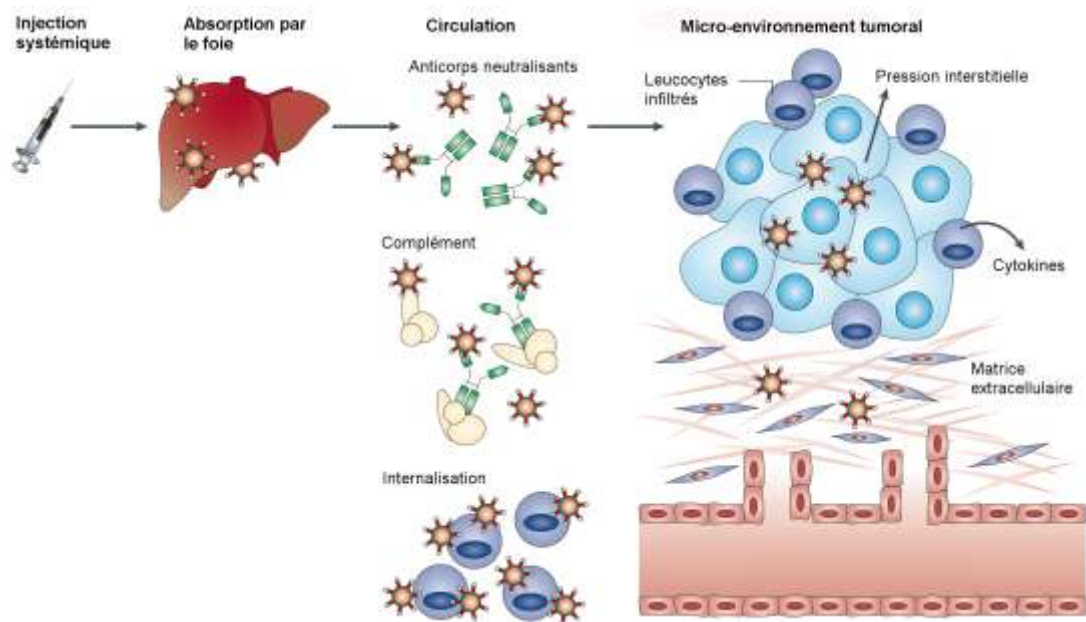


Figure 14 : Neutralisation des virus oncolytiques au sein de l'organisme

*L'injection systémique de virus oncolytiques se heurte à l'absorption des particules virales par les cellules hépatiques et à leur neutralisation dans la circulation sanguine par le complément, la phagocytose et les anticorps (en cas de pré-immunité due à la vaccination ou à une immunisation préalable). Au sein du micro-environnement tumoral, la propagation des virus est bloquée par les composants de la matrice extracellulaire et la production de cytokines antivirales par les cellules immunitaires infiltrées. (d'après Parato *et al.*, 2005)*

ii. *Moyens de contournement*

Plusieurs stratégies ont été mises en place afin d'éviter les effets inhibiteurs de l'immunité sur l'activité des virus oncolytiques. L'utilisation d'agents immunosuppresseurs tels que la cyclophosphamide (CP) permet par exemple d'augmenter l'efficacité de réovirus (*Qiao et al., 2008b*) ou d'ADV (*Thomas et al., 2008*) oncolytiques dans des modèles animaux immunocompétents en inhibant la réponse immunitaire antivirale. L'étude sur le réovirus montre plus précisément que l'utilisation de doses modérées de CP induit uniquement une réduction de la quantité, et non une inhibition totale, des anticorps neutralisants, permettant ainsi de contrôler la production virale et de limiter la toxicité du traitement sur les cellules saines. Une étude sur le gliome a par ailleurs montré que la CP améliorait de façon significative l'activité oncolytique d'un HSV *in vivo* en inhibant la réponse immunitaire innée, caractérisée par une baisse de l'infiltration des macrophages et une diminution de la production d'IFN- γ par les NK au sein de la tumeur (*Fulci et al., 2006*).

Les « cell carriers » (« transporteurs cellulaires ») sont une autre alternative permettant d'éviter les effets inhibiteurs du système immunitaire (*Cole et al., 2005*). Cette approche consiste à charger des virus à la surface ou à l'intérieur de cellules vivantes afin que ceux-ci puissent circuler librement dans l'organisme. Cette approche permet notamment d'envisager l'injection systémique de virus oncolytiques, puisque ces virus bénéficient à la fois de la protection vis-à-vis des mécanismes antiviraux, et en particulier des anticorps neutralisants, et d'un ciblage spécifique vers la zone tumorale si le « transporteur » choisi présente un tropisme particulier. Il a par exemple été montré que l'utilisation de lymphocytes T chargés avec un VSV oncolytique permettait de délivrer efficacement le virus dans des métastases ganglionnaires, en exploitant le tropisme de lymphocytes pour les organes lymphoïdes secondaires (*Qiao et al., 2008a*). D'autres transporteurs, tels que des cellules souches mésenchymateuses (*Mader et al., 2009*) ou des DC (*Iankov et al., 2009*), ont été testés pour transporter des virus oncolytiques. Dans ces deux études, l'activité oncolytique du virus MV est conservée grâce à sa protection vis-à-vis des anticorps neutralisants.

b. Synergie entre virothérapie et système immunitaire

i. *Amélioration de l'activité anti-tumorale*

Différents arguments plaident pour un rôle positif du système immunitaire dans les effets anti-tumoraux des virus oncolytiques (*Prestwich et al., 2008*). L'activation des cellules

NK dans le cadre d'un traitement par un virus influenza oncolytique (*Ogbomo et al., 2010*), ou l'augmentation des propriétés immuno-stimulatrices de DC humaines par des souches oncolytiques du réovirus (*Errington et al., 2008a*) ou du parvovirus H-1 (*Moehler et al., 2005*) ont ainsi montré le rôle prépondérant des cellules de l'immunité dans les effets anti-tumoraux de certains virus oncolytiques.

Le cas du VSV est ainsi représentatif de cette synergie entre l'activité oncolytique directe du virus et la réponse anti-tumorale induite. Plusieurs études récentes sur ce virus ont ainsi montré que l'activité anti-tumorale directe du VSV était assez peu efficace, mais que les propriétés adjuvantes du virus permettaient l'induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale forte permettant d'améliorer de façon significative l'élimination des cellules malignes (*Kottke et al., non publié*).

Dans le cadre de la virothérapie utilisant les poxvirus, et plus particulièrement les souches oncolytiques dérivées du virus de la vaccine, il a été montré que la destruction du tissu tumoral était associée à la sécrétion de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires et à l'infiltration de types cellulaires impliqués dans la réponse immunitaire anti-tumorale (lymphocytes T activés, NK, DC, macrophages, ...) (*Worschech et al., 2009a*). Les études précliniques réalisées par cette équipe ont par ailleurs montré que l'activation de la réponse immunitaire dépendait notamment de l'induction de gènes de réponse aux IFN de type I (*Worschech et al., 2009b*). De plus, dans cette étude l'induction de la réponse anti-tumorale précède la nécrose des cellules tumorales induite par l'infection, ce qui suggère que la synergie avec la réponse antivirale se mettrait en place de façon très précoce.

ii. Virus modifiés

L'intégration de gènes codant pour des protéines immuno-activatrices dans les virus oncolytiques permet de combiner l'activité oncolytique directe du virus et l'activation de la réponse immunitaire au sein même de l'environnement tumoral. De nombreux groupes développent ainsi des virus capables d'exprimer des cytokines, des chimiokines ou d'autres molécules immuno-stimulatrices.

Le GM-CSF est une cytokine centrale de la différenciation des macrophages et des DC. Plusieurs études se sont ainsi intéressées à l'impact de l'expression du GM-CSF sur l'efficacité anti-tumorale des virus oncolytiques. Deux de ces études menées sur un NDV (*Janke et al., 2007*) et un ADV (*Lei et al., 2009*) recombinants pour le GM-CSF ont notamment montré que ces virus induisaient l'activation de monocytes, de DC myéloïdes et de pDC. Différentes interleukines, dont l'IL-12 (*Shin et al., 2007*) ou l'IL-18 (*Ino et al., 2006*),

ont elles aussi montré des capacités à activer des réponses anti-tumorales, en plus de l'activité oncolytique directe des virus. Une autre étude a par ailleurs montré que l'injection d'un NDV oncolytique exprimant l'IL-2 induisait l'activation de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de cellules de mélanomes et une protection partielle contre un nouveau challenge tumoral (Zamarin et al., 2009).

D'autres molécules immuno-stimulatrices peuvent être utilisées pour améliorer l'efficacité anti-tumorale des virus oncolytiques. Ainsi, l'IFN- α exprimé par un ADV oncolytique augmente l'activité anti-tumorale de ce virus dans des modèles immunocompétents en comparaison de modèles immunodéficients (Brin et al., 2006). RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted), aussi connue sous le nom de CCL5, est une chimiokine intervenant dans le recrutement des leucocytes, une étape cruciale pour l'activation du système immunitaire au sein de la tumeur après virothérapie. Le gène de RANTES a été inséré dans un ADV afin de traiter des cellules de lymphome ou de carcinome mammaire métastatique humains chez la souris (Lapteva et al., 2009b). Dans cette étude, ce virus modifié a démontré une forte activité anti-tumorale associée à une importante infiltration de DC, de macrophages, de NK et de lymphocytes T CD8, ainsi qu'à la production d'IFN- γ et d'IL-12 au sein des tumeurs.

La modification des virus oncolytiques dans le but d'activer la réponse immunitaire anti-tumorale ne se limite pas à l'insertion de gènes codant pour des cytokines ou des chimiokines. L'activation des TLR demeure par exemple une étape critique pour l'activation de la réponse immunitaire. Une équipe a ainsi développé un parvovirus H-1 modifié pour présenter des motifs CpG dans son génome (Raykov et al., 2008). Cette modification induit l'activation de TLR9 dans les pDC, déclenchant ainsi la surexpression de CD80 et de CD86 ainsi que l'augmentation de la sécrétion d'IFN- γ dans les ganglions lymphatiques. Une autre étude a montré que l'expression de la β -defensin-2, un activateur du TLR4, par un ADV, induisait le recrutement de pDC dans la tumeur et le déclenchement d'une réponse anti-tumorale en plus de l'activité oncolytique directe du virus (Lapteva et al., 2009a).

Actuellement, différentes équipes développent des vecteurs viraux oncolytiques dans lesquels sont insérés des antigènes de tumeur (Wongthida et al., 2011). Ce type de travaux devrait permettre d'améliorer l'induction de la réponse immunitaire anti-tumorale adaptative et par conséquent l'efficacité générale des stratégies d'immuno-virothérapie.

iii. Molécules de danger

Les infections virales modifient le micro-environnement tumoral et peuvent ainsi favoriser l'induction d'une réponse immunitaire dirigée contre les antigènes tumoraux. Les composants viraux eux-mêmes sont notamment susceptibles de favoriser cette immunogénicité, mais des facteurs cellulaires endogènes sont aussi impliqués dans le déclenchement de la réponse immune. Différentes molécules de danger peuvent ainsi être produites et/ou libérées pendant l'infection virale et après la mort des cellules tumorales infectées. Ce contexte immunogène, associé à la libération ou à la présentation d'antigènes tumoraux, participerait alors à la promotion de la réponse immunitaire spécifique.

Les HSP, et en particulier Hsp70, sont impliquées dans l'immunogénicité de la mort induite par les infections virales (*Melcher et al., 1998*). Ces protéines interviennent par exemple dans la réponse immunitaire induite par le virus MV (*Oglesbee et al., 2002*). Une étude sur le parvovirus oncolytique H-1 a ainsi montré que la libération de la protéine de stress inductible Hsp70 participait à l'induction de la réponse immunitaire anti-tumorale spécifique (*Moehler et al., 2003*). Différents groupes ont par ailleurs développé des virus oncolytiques codant pour Hsp70 afin d'améliorer leur activité anti-tumorale (*Huang et al., 2003 ; Ren et al., 2008*). Un essai clinique de phase I portant sur un ADV exprimant Hsp70 a d'ailleurs été récemment publié (*Li et al., 2009*).

L'infection virale et l'induction de la mort cellulaire sont aussi associées à la libération de HMGB-1 (*Wang et al., 2006b*). Des travaux sur les virus influenza (*Allewa et al., 2008*), le Virus de l'Immunodéficiência Humaine-1 (*Barqasho et al., 2010*) ou les ADV (*Barlan et al., 2011*) ont par exemple montré que ces virus provoquaient la libération de la molécule HMGB-1 par les cellules infectées. Dans le cadre des virus oncolytiques, quelques études ont par ailleurs démontré que l'infection spécifique de cellules tumorales induisait la libération de HMGB-1 et était souvent associée à l'activation d'une réponse immunitaire anti-tumorale : *Candolfi et al.* ont ainsi développé un traitement combiné entre un ADV exprimant Flt3-Ligand et un HSV oncolytique contre des cellules de gliome *in vivo* (*Candolfi et al., 2009*). Ils ont montré que l'efficacité anti-tumorale de ce traitement était dépendante de la libération de HMGB-1 par les cellules infectées ; la glycyrrhizine, un inhibiteur spécifique de HMGB-1, est en effet capable d'abolir totalement l'efficacité de ce traitement. Un autre travail sur le virus de la vaccine a par ailleurs montré que HMGB-1 était impliquée dans l'effet synergique entre l'activité oncolytique de ce virus et l'effet anti-tumoral du paclitaxel (*Huang et al., 2011*).

Une revue récente détaille différentes stratégies développées par les virus afin de limiter l'immunogénicité de la mort cellulaire après infection (*Kepp et al., 2009*). Il reste donc à mieux définir la capacité des virus oncolytiques à provoquer ou à inhiber l'immunogénicité de la mort cellulaire. Ces résultats permettraient de déterminer l'impact de la production et/ou de la libération de molécules de danger au sein de l'environnement tumoral sur l'efficacité clinique de la virothérapie.

IV. Objectifs de la thèse

Le mésothéliome, le mélanome ou les adénocarcinomes pulmonaires et colorectaux sont des cancers agressifs qui, dans de nombreux cas, restent réfractaires aux thérapies actuelles et nécessitent une amélioration de leur prise en charge clinique.

La survenue du mésothéliome pleural malin (MPM) est liée dans la majorité des cas à une exposition prolongée à des fibres d'amiante, le plus souvent dans un cadre professionnel. Le MPM provoque la formation de plaques au niveau de la plèvre, associée à un épanchement pleural qui se caractérise par l'accumulation de liquide entre les deux feuillets pariétal et viscéral de la plèvre. En dehors de l'analyse immunohistologique, le diagnostic du MPM reste difficile puisque des affections inflammatoires et d'autres types de cancers tels que des adénocarcinomes pulmonaires peuvent provoquer des symptômes similaires (*Scherpereel et al., 2010 ; Rudd, 2010*). Le MPM est considéré comme un cancer rare touchant principalement les populations des pays industrialisés et des pays en développement. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques demeure cependant essentiel à moyen terme puisque le pic du nombre de cas de MPM dans les pays occidentaux est attendu pour la période 2015-2020 et que l'amiante est toujours utilisée de façon intensive dans les pays en développement. De plus, les traitements actuels du MPM demeurent très peu efficaces : la décortication de la plèvre est une opération chirurgicale lourde, la radiothérapie est utilisée de façon palliative ou en complément de la chirurgie et les chimiothérapies (cisplatine, pemetrexed, vinblastine, ...) n'améliorent que très faiblement la survie des patients.

Les mélanomes et les adénocarcinomes pulmonaires et colorectaux présentent aussi des résistances aux traitements anti-tumoraux, notamment aux stades avancés. Ainsi, seulement 10% des patients atteints de mélanomes métastatiques survivent au-delà de cinq ans après le diagnostic (*Garbe et al., 2011*).

L'ensemble de ces données plaide pour le développement de nouveaux types de traitements anti-tumoraux. Les stratégies d'immunothérapie présentent un potentiel intéressant, notamment pour des cancers tels que le mésothéliome ou le mélanome où l'infiltration de cellules immunitaires spécifiques a déjà été décrite (*Robinson et al., 2001*). Cependant, les résultats obtenus jusqu'ici, par exemple dans les protocoles de vaccination anti-tumorale, restent plutôt décevants (voir partie II.3) et nécessitent d'être améliorés. L'efficacité de ce type de traitements dépend notamment de la composition du micro-

environnement tumoral qui peut participer à l'inhibition des réponses immunitaires anti-tumorales spécifiques.

Notre équipe a pour objectif d'utiliser des traitements cytotoxiques (inhibiteurs des Histone Déacétylases, virus oncolytiques, ...) capables à la fois de cibler les cellules tumorales et de provoquer leur mort dans un contexte immunogène. L'immunogénicité de la mort cellulaire induite par ces traitements pourrait alors favoriser le développement d'une réponse anti-tumorale capable d'agir en synergie avec l'agent cytotoxique ; la mise en place d'une mémoire immunitaire à plus long terme pourrait elle permettre de protéger le patient de récurrences éventuelles.

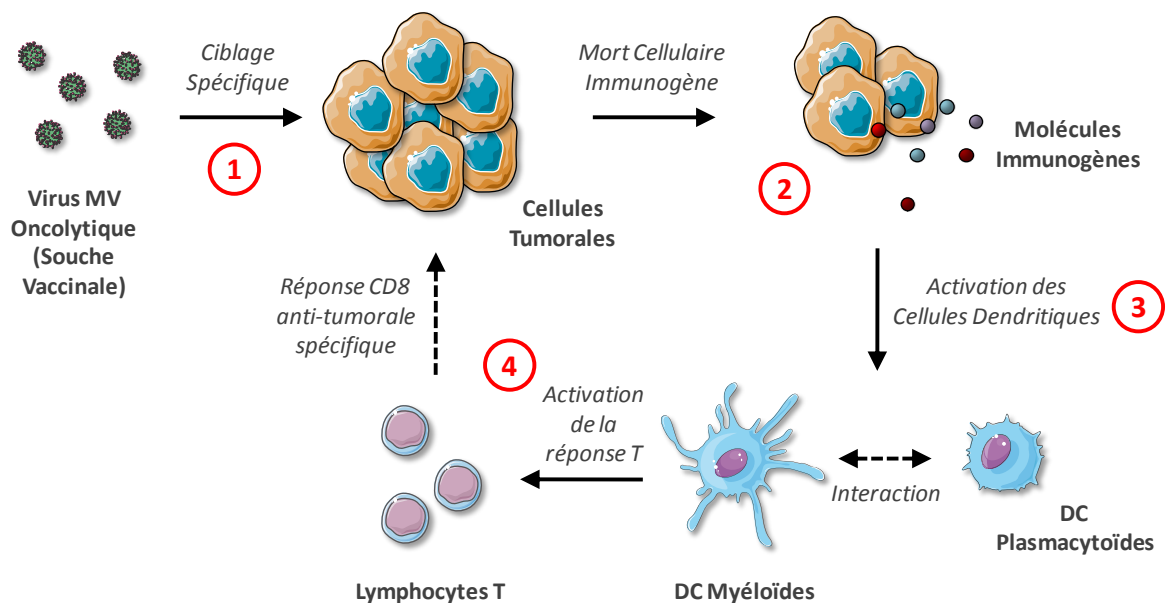


Figure 15 : Vue d'ensemble du projet

La souche vaccinale du virus de la rougeole est connue pour sa spécificité envers certaines cellules tumorales (1). Le virus MV induit l'apoptose des cellules tumorales infectées ; cette mort cellulaire s'accompagnerait de la production de molécules présentant des propriétés immunogènes (2). Notre hypothèse est que ce contexte puisse être favorable à l'activation de cellules dendritiques (DC) (3) capables à leur tour d'activer une réponse effectrice dirigée contre les antigènes de tumeur (4).

La virothérapie anti-tumorale apparaît comme une voie intéressante puisqu'elle permet d'une part de cibler spécifiquement les cellules tumorales et d'autre part d'induire l'activation du système immunitaire grâce au contexte infectieux et à la destruction des cellules tumorales infectées. Dans cette optique, la souche Schwarz atténuée du virus de la rougeole (MV) présente de nombreux avantages, aussi bien du point de vue du ciblage spécifique des cellules tumorales que de la sécurité d'utilisation.

Jusqu'à très récemment, le rôle positif du système immunitaire dans l'efficacité de la virothérapie anti-tumorale était négligé. En effet, différents arguments faisaient état d'une inhibition de l'activité oncolytique des virus par les effecteurs de l'immunité, notamment les anticorps et les cellules phagocytaires.

Les objectifs de mon travail de thèse, schématisés dans la Figure 15, ont donc été :

(i) de caractériser l'activité oncolytique du virus de la rougeole vis-à-vis de cellules tumorales dérivées de mésothéliomes, de mélanomes, d'adénocarcinomes pulmonaires et colorectaux (n°1 sur la Figure 11) en analysant l'expression des récepteurs d'entrée, l'efficacité d'infection et l'induction de la mort cellulaire *in vitro* et *in vivo*,

(ii) d'étudier la prise en charge, par les cellules dendritiques humaines, des cellules tumorales infectées par le virus MV oncolytique puis l'activation de la réponse lymphocytaire T contre ces cellules tumorales (n°3 et 4), et

(iii) d'analyser la production de facteurs de danger par les cellules tumorales infectées (n°2) afin de déterminer le caractère immunogène de la mort des cellules tumorales induite par le virus MV.

RÉSULTATS

I. Activité oncolytique de la souche vaccinale du virus de la Rougeole

1. Article

Natural oncolytic activity of live-attenuated measles virus against human melanoma, lung and colorectal cancers

Nicolas Boisgerault¹, Jean-Baptiste Guillaume¹, Daniel Pouliquen¹, Mariana Mesel-Lemoine², Jean-François Fonteneau¹, Frédéric Tangy² and Marc Grégoire^{1*}

¹INSERM, U892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, IRTUN, 8 quai Moncousu, BP70721, 44007 Nantes Cedex 1, France

²Institut Pasteur, Laboratoire de Génomique Virale et Vaccination, 28 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France

*Correspondence should be addressed to M.G. (marc.gregoire@inserm.fr)

Tel: +33 (0)2-28-08-02-37

Fax: +33 (0)2-28-08-02-04

Short title: Oncolysis of aggressive cancers by measles virus

Abstract:

Cancer virotherapy is widely regarded as a new alternative for the treatment of cancers that are resistant to conventional anti-cancer therapies. Indeed, some oncolytic viruses are currently being tested in clinical trials or have even obtained commercial authorization. Measles virus (MV) exhibits natural anti-tumor properties by specifically targeting cancer cells without infecting the healthy ones. This specific infection relies on the targeting of complement regulatory protein CD46 which is overexpressed on the surface of tumor cells. Melanoma, and lung and colorectal adenocarcinomas are very aggressive, with high resistance to conventional anti-cancer therapies. We have demonstrated that a live-attenuated strain of MV displays oncolytic activity against these aggressive neoplasms by inducing cell death *in vitro*. *In vivo*, we observed that oncolytic MV was able to eradicate high tumor burdens of human melanoma xenografts and to stop the growth of lung and colorectal adenocarcinoma xenografts. This oncolytic activity of MV was associated with *in-vivo* activation of caspase-3, as shown by immunohistochemical staining. Our results provide new arguments for the use of MV as an anti-tumor therapeutic agent against aggressive human malignancies.

Introduction:

Cancer virotherapy has emerged in the last decade as an interesting alternative to conventional anti-cancer therapies [1]. This strategy consists of the use of specific, replication-competent viruses to target cancer cells and could help to cure cancers that are refractory to usual treatments such as surgery, chemotherapy and radiotherapy. Indeed, the use of oncolytic viruses allows specific targeting of cancer cells in association with powerful induction of cancer cell death, as has been previously shown against different types of human tumor xenografts *in vivo* [2-3]. Specific oncolytic viruses can also be engineered, allowing the

improvement of direct, anti-tumor properties and the induction of anti-tumor immune responses [4]. Some of these engineered viruses are currently being tested in clinical trials [5-6] or have even achieved commercial authorization, such as H101 adenovirus [7].

Cancer virotherapy focuses on achieving specificity, with the aim of leaving normal tissues unharmed. Interestingly, vaccinal strains of measles virus (MV) demonstrate natural oncolytic properties by specifically targeting different types of cancer cells but not healthy cells [8-9]. Oncolytic MV preferentially infects tumor cells by targeting the CD46 membrane complement regulatory molecule [10-11] which is frequently overexpressed in cancer cells [12], as it provides protection against the complement innate defense system. Given that oncolytic strains of MV derived from the Edmonston vaccinal lineage have been used for decades in the immunization of hundreds of millions of children, and that reversion to wild-type strains has never been observed, MV exhibits considerable advantages for use as a therapeutic agent, even for an anti-tumor purpose. Indeed, different studies have shown an inability of MV to infect healthy tissues efficiently [13]. The authors of a recent, phase-I clinical trial carried out in patients with refractory ovarian cancers [14] reported that treatment was well-tolerated and noticed a dose-dependent biological activity of oncolytic MV.

An interesting property of oncolytic viruses could be their ability to bypass resistance to the induction of cell death in aggressive cancers. Thus, certain cancers such as melanoma and lung and colorectal adenocarcinomas, known to be resistant to standard cytotoxic treatments, should be evaluated in clinical studies using direct infection with live-attenuated oncolytic MV. Here, we show for the first time that an oncolytic strain of MV is able to specifically infect and kill tumor cells derived from melanoma and lung and colorectal adenocarcinomas, *in vitro*. Moreover, oncolytic MV showed *in-vivo*, anti-tumor properties against high tumor burdens of human xenografts associated with the activation of caspase-3. Altogether, our

results demonstrate the interest of developing therapies using oncolytic MV against aggressive neoplasms.

Results:

1) Cancer cell lines from aggressive human cancers are efficiently infected by oncolytic MV

A large panel of cancer cells derived from human melanomas and lung and colorectal adenocarcinomas or mesotheliomas were chosen to characterize the oncolytic activity of measles virus (MV) against these cancers.

The kinetics of mesothelioma cell infection with MV-eGFP (**Fig. 1a**) were consistent with our previous observations [9]. Maximal infection rates at 72 h post-infection reached 90% of infected cells for Meso13, 68% for Meso11, 64% for Meso96 and 45% for Meso47, but only 19% for Meso56 cells. Normal mesothelial cells, MSO-1, were only slightly infected, with 3% of eGFP⁺ cells 72 h after infection (**Fig. 1b**).

Lung adenocarcinoma cells showed differing MV infection profiles. A549 (88%) and ADK153 (65%) cells were efficiently infected. Conversely, infection of ADK3 cells progressed slowly with only 29% of infected cells 72 h after infection, while ADK117 cells overcame infection after 72 h (6% of infected cells).

The four colorectal adenocarcinoma cell lines tested were efficiently infected by the oncolytic strain of MV. However, whereas SW480 and SW620 cells were almost completely infected after 3 days, with 87% and 93% of infected cells, respectively, we observed less eGFP⁺ HT29 (51%) and CaCo-2 (37%) cells at the same time-point. Further microscopic analyses revealed that these two cell lines underwent rapid lysis after infection and, thus, released eGFP into the extracellular medium, thereby lowering eGFP⁺ cell percentages (data not shown).

Finally, 3 of 5 melanoma cell lines tested showed high infection rates. Three days after infection, M6, M88 and M113 cells were infected at 96%, 85% and 79%, respectively. Conversely, M17 (18%) and M117 (3%) cells appeared to be more resistant to MV.

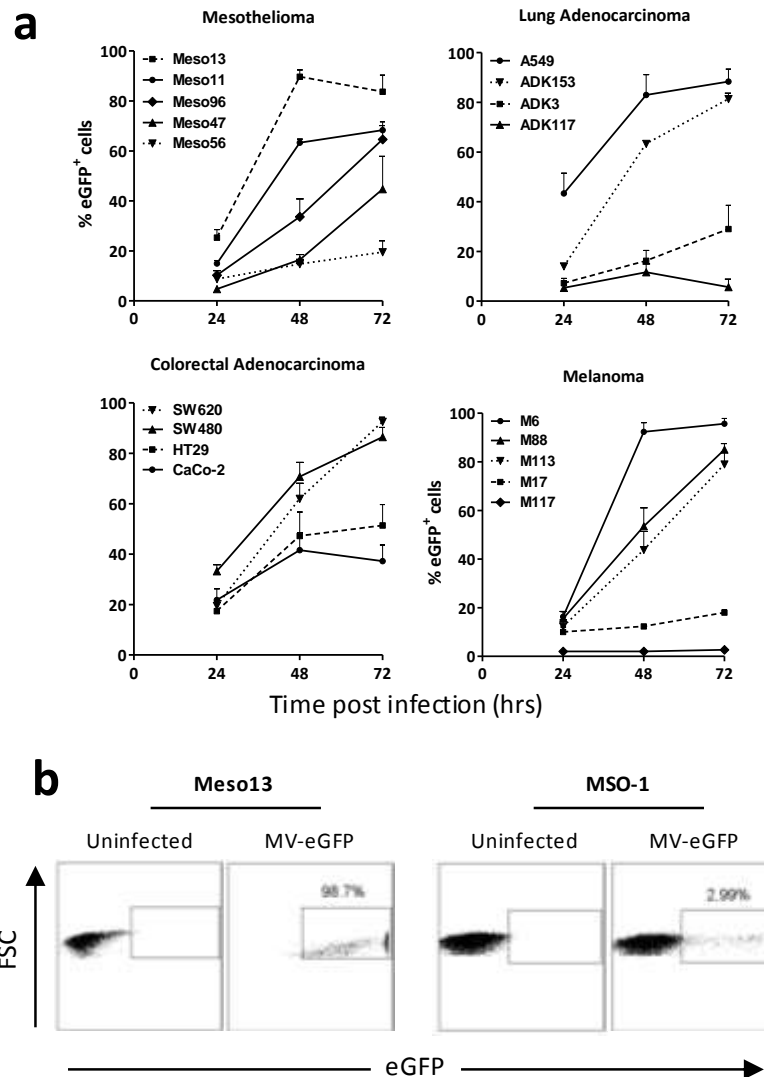


Figure 1. Infection of tumor cells by oncolytic MV-eGFP

(a) Tumor cells were infected with MV-eGFP (MOI=1) for 2 h before renewal of the culture medium. Cells were then analyzed by flow cytometry at 24, 48 and 72 h post-infection to determine the percentages of eGFP⁺ cells. Data represent the mean ± SEM, (n=3).

(b) Meso13 mesothelioma cells and MSO-1 normal mesothelial cells were infected and analyzed as described in a. Data represent one of three similar experiments.

2) MV induces cell death of infected lung, colorectal and skin cancer cells:

Given that cancer cell lines were differently infected by oncolytic MV, we analyzed the induction of cell death after infection. Firstly, we characterized MV-induced cytopathic effects by fluorescence microscopy (**Fig. 2**). MV infection induced the formation of giant, multinucleated cells, namely syncytia, created by the fusion of infected tumor cells with neighboring cells. We observed such a process for all efficiently-infected tumor cell lines derived from the four tested cancers (data not shown). Moreover, we noticed the detachment of MV-induced syncytia from the plate support, demonstrating the induction of tumor cell death by MV infection. The infection process, syncytia formation and cell death induction of MV-infected Meso13 mesothelioma cells were studied in detail for 72 h by time-lapse microscopy (**Fig. S1**).

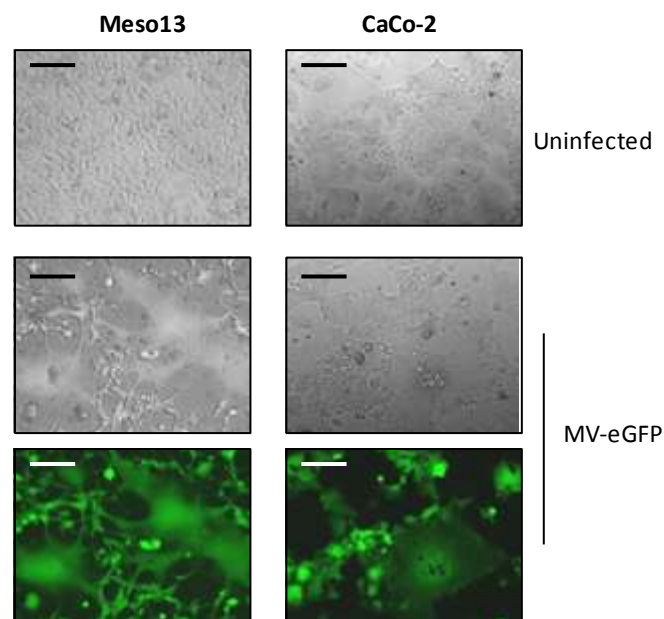


Figure 2. Cytopathic effects of measles virus

Meso13 and CaCo-2 were seeded in 6-well culture plates, infected (MV-eGFP, MOI=1, 2 h) or not and observed by phase contrast (upper pictures) and fluorescence microscopy (lower pictures) 72 h after infection.

Scale bars: 50 μ m

To better characterize cell death induction after MV infection, we performed annexinV/propidium iodide double staining (**Fig. 3**). As expected, we demonstrated that oncolytic MV was able to induce cell death of efficiently-infected cells. Indeed, Meso11, Meso13, Meso47, Meso96, A549, ADK153, CaCo-2, HT29, SW480, SW620, M6 and M88 cells showed a substantial increase in cell death compared with uninfected cells. Conversely, death induction for Meso56, ADK3, ADK117, M17 and M117 cells was minimal, consistent with their relatively low infection rates displayed in **Fig. 1**. Unexpectedly, the percentage of annexinV⁺ highly-infected M113 melanoma cells was similar to that of their uninfected counterparts. This result suggests a resistance to MV-induced apoptosis, potentially due to the lack of pro-apoptotic molecules or the induction of a type I interferon response. Nevertheless, cell death induction analysis demonstrated that oncolytic MV was effectively able to infect and kill cancer cells derived from human melanomas, and lung and colorectal adenocarcinomas, *in vitro*.

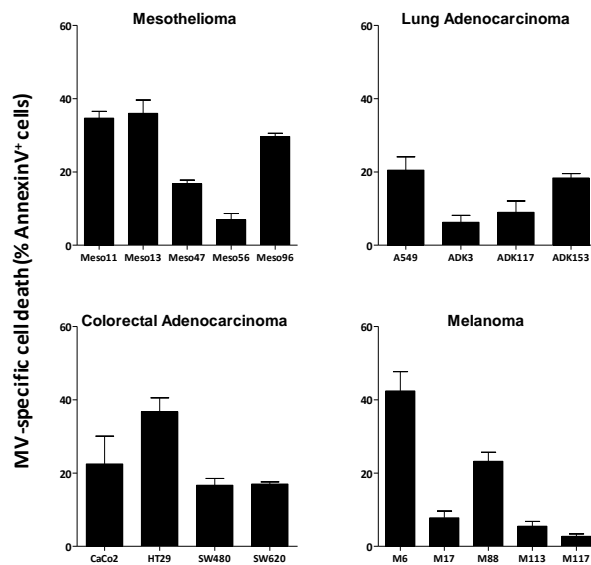


Figure 3. *In-vitro* induction of tumor cell death by MV

Cell death induction of MV-infected (MOI=1, 2 h) and uninfected tumor cells was analyzed by flow cytometry after double staining with annexinV-FITC and propidium iodide. Data represent the increase in levels of cell death between uninfected cells and their MV-infected counterparts (Mean ± SEM, n=3).

3) CD46 is highly expressed in lung and colorectal cancers, but not in melanoma:

Considering the discrepancies in infection and cell death induction by oncolytic MV, we studied the expression of the MV receptors, CD46 and CD150/SLAM (signaling lymphocyte activation molecule), in the different cell lines and their healthy counterparts.

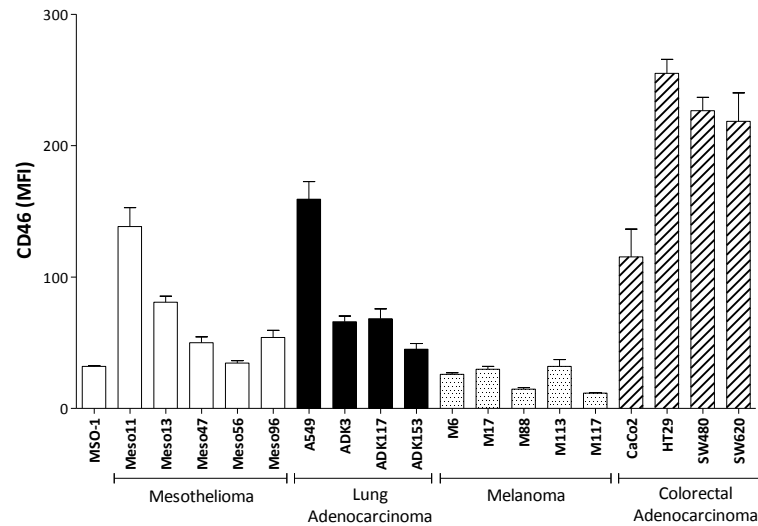


Figure 4. Expression of CD46 receptor on tumor cells

Surface expression of CD46 on MSO-1 normal cells and tumor cells was determined by flow cytometry after staining with a FITC-conjugated anti-CD46 antibody (Mean \pm SEM, n=3).

Here we confirm that a majority of highly-infected tumor cells exhibited a higher CD46 surface level than healthy cells (**Fig. 4**). Indeed, Meso11 (MFI=138), Meso13 (81), Meso47 (50), Meso96 (54), A549 (159), CaCo-2 (115), HT29 (255), SW480 (227) and SW620 (219) were efficiently infected and triggered to cell death, which is consistent with their high expression of the CD46 receptor compared with normal cells (MFI=32). On the contrary, Meso56 (MFI=34), M17 (30) and M117 (12) exhibited a low surface level of CD46, accounting for their poor infection rates and low induction of apoptosis following MV infection.

Interestingly, CD46 expression analysis was not sufficient to predict the infection levels of lung adenocarcinoma and melanoma cell lines. For instance, CD46 was highly expressed in ADK3 (MFI=66) and ADK117 (68) adenocarcinoma cell lines, but these cells were less efficiently infected than ADK153 cells (MFI=45). All melanoma cell lines tested displayed very low CD46 surface expression levels (MFI from 12 to 32), despite 3 of 5 of them being efficiently infected by MV.

In order to understand the differences that we observed between infection rates and CD46 expression, we studied the expression of the other MV receptor, CD150/SLAM. This molecule is especially involved in the infection of immune cells by wild-type MV. However, none of the cell lines tested exhibited cell surface CD150/SLAM expression, except for a slight expression of this receptor by M88 melanoma cells (data not shown). Thus, our results suggest the involvement of an alternative mechanism for MV infection, independent of CD46 and CD150/SLAM, as has been suggested by previous studies [15-17].

4) Oncolytic MV induces tumor regression *in vivo*:

To confirm our *in-vitro* results, we studied the ability of oncolytic MV to efficiently target and kill human melanoma, and lung and colorectal adenocarcinoma, xenografts *in vivo* in *nude* mice (**Fig. 5**). We chose to treat high tumor burdens (100 to 200 mm³) to better characterize the oncolytic activity of MV against established tumors.

Human M6 melanoma xenografts were treated by a single intra-tumoral injection of oncolytic MV (MOI=1,5.10⁷ TCID₅₀). The volumes of treated melanomas were strikingly reduced after MV treatment, compared with PBS-injected mice. Our results showed a dramatic decrease in tumor volumes 20 days after injection of oncolytic MV (mean=63 mm³) whereas tumors

continued to grow in control mice (320 mm³; $P < 0.01$). Moreover, 5 of 13 treated mice showed complete eradication of tumor cells, resulting in the formation of healing tissues under the skin with no cancer cells remaining (data not shown). After 20 days, we also observed a significant difference ($P < 0.001$) between tumor masses of control mice (mean=202 mg) and MV-injected mice (53 mg).

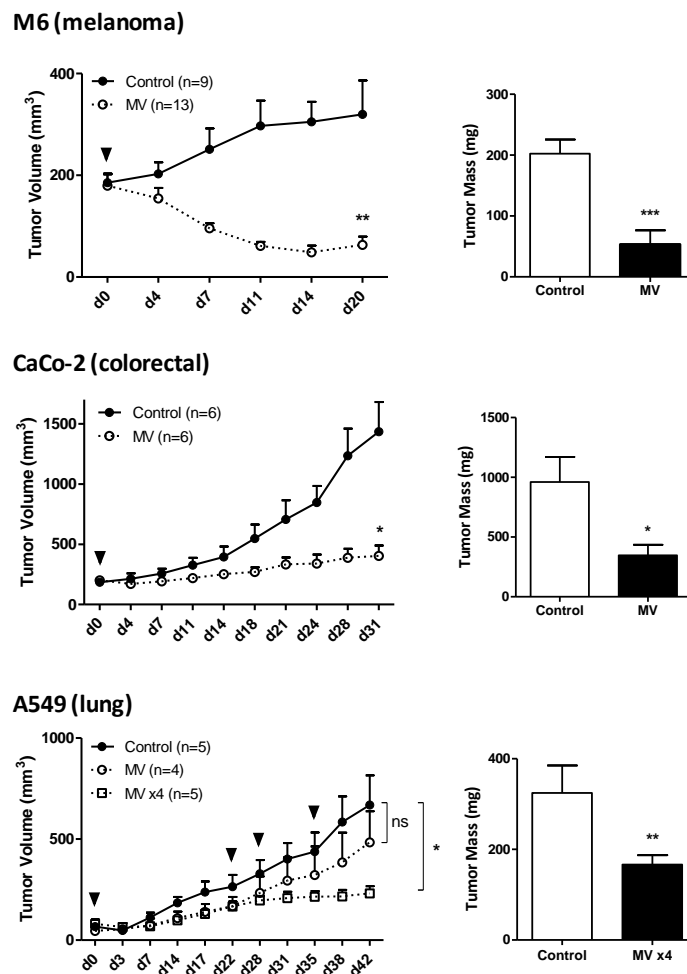


Figure 5. Oncolytic MV induces tumor cell death *in vivo*

Nude mice were injected subcutaneously with 1 million human M6, CaCo-2 or A549 cells. When tumors had reached a constant volume, MV-eGFP or PBS were injected intratumorally as indicated by arrowheads (day 0, MOI=1,5.10⁷ TCID₅₀) and tumor volumes were measured twice weekly. Additional MV injections were performed for A549 mice at days 22, 28 and 35. At the end of experiments, harvested tumors were evaluated for their masses (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

We obtained similar results with CaCo-2-bearing mice, albeit that treatment by oncolytic MV resulted more in growth arrest than in complete tumor eradication. However, CaCo-2 cells are very aggressive and tumor growth was very substantial in PBS-injected compared with MV-treated animals. Indeed, we observed remarkable differences between control and MV-treated mice regarding tumor volumes (1118 mm³ vs. 262 mm³; $P < 0.05$) and masses (867 mg vs. 227 mg; $P < 0.05$) after 31 days.

Treatment of human A549 lung adenocarcinoma xenografts showed a different profile. Indeed, even though MV induced a delayed tumor growth, we did not obtain any significant difference between PBS- (668 mm³) and MV-treated (484 mm³) animals due to the high proliferation capacities of these cells. Thus, we chose to carry out multiple injections of oncolytic MV. We performed these additional MV injections at 22, 28 and 35 days after the initial injection at day 0. This treatment actually stopped tumor growth, as shown by the differences in tumor volumes between the untreated (668 mm³) and multiple injections groups (231 mm³; $P < 0.05$). Tumor masses were measured 42 days after infection and were also found to be significantly different from those of PBS-injected mice (166 mg vs 324 mg; $P < 0.01$).

5) MV infection induces caspase-3 activation:

Caspase-3 is known to be involved in late events of the apoptosis program. We, thus, performed immunohistochemical staining of activated caspase-3 on MV-treated and PBS-injected tumors (**Fig. 6**). In PBS-injected M6 tumors, some rare tumor cells were found to exhibit activated caspase-3 staining due to physiological induction of apoptosis. However, we were not able to identify any large area of caspase-3 activation. In contrast, MV-treated tumors exhibited a substantial level of staining throughout the entire tumor, associated with

areas of advanced cell death as shown by condensed nuclei, areas of lysis and the formation of healing tissue.

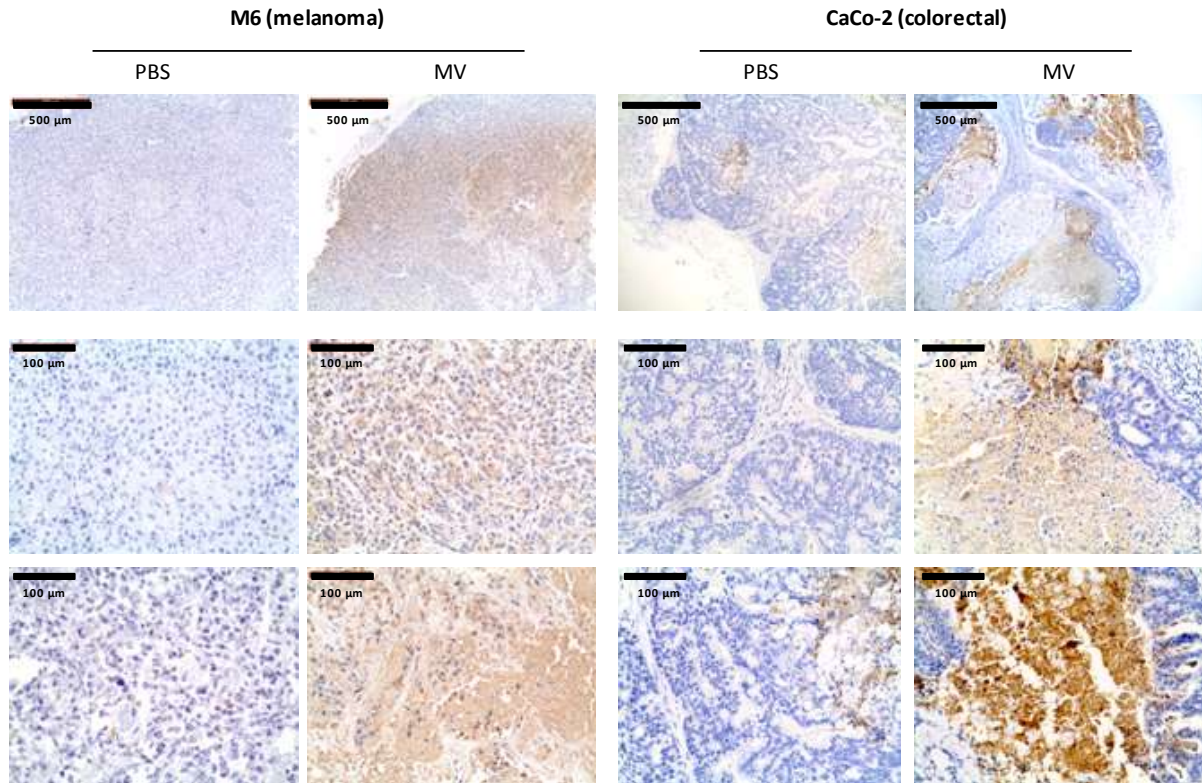


Figure 6. Activation of caspase-3 in tumors after MV infection

MV-treated and PBS-injected mice were harvested, fixed in 4% paraformaldehyde, set on slides and stained with an anti-active-caspase-3 antibody and a peroxidase anti-mouse secondary antibody. Tumors were then analyzed by microscopy.

CaCo-2 colorectal tumors grew in a specific way by forming round structures (**Fig. 6**). In PBS-injected mice, we observed small areas of caspase-3 activation in the centers of the round structures. This cell death induction is likely to be a consequence of hypoxic stress. In contrast, we observed strong activation of caspase-3 in MV-treated tumors, accounting for the *in-vivo* oncolytic activity of MV against CaCo-2 colorectal adenocarcinoma cells. Regarding A549 lung adenocarcinoma cells, we could not observe caspase-3 activation in PBS-injected tumors or in MV-treated mice (data not shown).

Discussion:

We have demonstrated for the first time that live-attenuated oncolytic measles virus (MV) exhibits both *in-vitro* and *in-vivo* anti-tumor activity against human melanomas, and lung and colorectal adenocarcinomas. As these cancers are described as being refractory to anti-tumor treatments [18], our findings add interest to the use of MV as an anti-cancer therapeutic agent [8].

These results support numerous, previous studies showing that MV displays oncolytic properties against a wide range of human cancers [19]. For example, live-attenuated strains of measles viruses (MV) derived from the Edmonston vaccinal lineage have been widely studied as oncolytic agents against lymphoma [2], glioblastoma multiforme [20], multiple myeloma [21], ovarian [13] and breast [22] carcinomas, prostate cancer [23] and leukemia [24].

In this study, we found that CD46 was highly expressed in a majority of lung and colorectal adenocarcinoma cell lines. Consequently, these cells exhibited high MV infection rates. Moreover, oncolytic MV was able to induce substantial regressions of these tumors in *nude* mice. These results are consistent with previous observations, as Fishelson and colleagues reported the overexpression of CD46 membrane complement regulatory protein in both lung and colorectal carcinomas compared with normal counterparts [12].

Conversely, we were unable to detect CD46 receptor overexpression in the melanoma cell lines that we tested. It has been known for several years that CD46 complement regulatory protein serves as an entry receptor for live-attenuated MV strains derived from the Edmonston lineage, whereas SLAM/CD150 serves as an entry receptor for both live-attenuated and wild-type strains [25]. Moreover, Anderson and colleagues demonstrated that the CD46 expression level was critical for the primary infection of tumor cells and subsequently for the transmission of new viruses to neighboring cells by participation in the formation of multinucleated syncytia [26]. Surprisingly, our results concerning melanoma cell infection

call into question this “CD46 model” for oncolytic targeting of tumor cells by vaccinal MV and, thus, raise major questions about its mechanism. Every melanoma cell line that we tested showed a relatively low CD46 expression level on the cell surface compared with mesothelioma, lung and colorectal adenocarcinoma cells. Nevertheless, we observed efficient infection and apoptosis induction *in vitro*, and also very efficient tumor regressions *in vivo* in immunodeficient mice. For these melanoma cells, infection did not actually correlate with CD46 expression, and consequently it was not possible to predict the efficacy of MV infection by studying their CD46 surface expression. Again, the efficient infection of melanoma cells was not dependent on CD150/SLAM as only M88, but not M6 and M113, cells showed slight expression of this molecule. As suggested by previous studies [16-17], infection of these cells could depend on an “epithelial-type” alternative receptor that remains to be identified. Further experiments are needed to determine the involvement of this potential “third receptor”, independent from CD46 and CD150/SLAM. Melanoma cells would be a suitable model for studying this new potential mechanism and to improve the use of oncolytic MV as a therapeutic agent for an anti-tumor purpose.

We found that some tumor cell lines exhibited high infection rates associated with poor induction of cell death. These results raise major questions about resistance to cancer virotherapy. It has been shown recently that the Bcl-2 family of proteins can delay induction of cell death after MV infection [24]. We aim to develop new MV-derived vectors exhibiting increased pro-apoptotic properties in order to target the MV-resistant tumor cells [27].

Recent investigations also demonstrated the efficacy of combining oncolytic viruses with chemotherapeutic drugs [28]. For instance, histone deacetylase inhibitors were found to improve the oncolytic properties of both vesicular stomatitis virus [29] and herpes virus [30]. In addition, some studies have shown the successful combination of oncolytic viruses with radiotherapy [31-32]. Another strategy would be the combination of oncolytic viruses with

immunotherapy, in order to associate direct oncolysis with an adaptive, anti-tumor immune response. Some reports have described tight implication of the immune system following treatment with oncolytic viruses [9,33-34], while other groups have used engineered oncolytic viruses expressing pro-immune molecules [4]. Cancer immunotherapy has been an area of extensive investigation during the last twenty years, but with relatively poor results to date. From now on, danger signals could be the keystone for the development of cancer immunotherapies. Oncolytic viruses could create an immunogenic environment by inducing the release of immunogenic molecules and tumor antigens after the induction of cell death, as has been previously shown with other anti-tumor strategies [35]. As we were able to induce specific tumor cell death both *in vitro* and *in vivo*, oncolytic MV would be an excellent candidate for such a strategy.

Our experiments confirm that a wide variety of cancers are potential targets for MV-based cancer virotherapy. Moreover, whereas previous studies have only shown a slowing down of tumor growth [36], we were able to observe significant tumor regressions, or even complete eradications for melanoma, even after single MV injections. Likewise, we demonstrated a long-term stabilization of lung and colorectal adenocarcinoma tumor volumes. These results provide new arguments for the development of cancer treatments using non-engineered oncolytic MV.

Materials and Methods:

- Cell culture:

Meso11, Meso13, Meso47, Meso56 and Meso96 epithelioid mesothelioma cell lines, ADK3, ADK117 and ADK153 lung adenocarcinoma cell lines were established and characterized

[37] in our laboratory from pleural effusions collected by thoracentesis of cancer patients, with informed consent. M6, M17, M88, M113 and M117 melanoma cell lines were a kind gift from B. Dreno and N. Labarrière (Cancer Research Centre, Nantes, France). The A549 lung adenocarcinoma cell line, CaCo-2 and HT29, SW480 and SW620 metastatic colorectal adenocarcinoma cell lines were purchased from ATCC, and MSO-1 normal mesothelial cells were purchased from tebu-bio (Le Perray-en-Yvelines, France). 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). Cells were cultured at 37°C in a humidified, 5% CO₂ atmosphere and were routinely checked for *Mycoplasma* contamination by PCR.

- Flow cytometry:

Cells were incubated for 30 min with a FITC-conjugated, anti-CD46-FITC or a PE-conjugated, anti-CD150/SLAM (both from BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) antibody for extracellular staining. Cells were then washed 3 times with PBS before analysis by flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences).

- *In-vitro* infection and cell death analysis:

Live-attenuated, recombinant, MV-enhanced green fluorescent protein (MV-eGFP) virus was produced as previously described [9]. Viral infections were performed at MOI=1.0 TCID₅₀ for 2 h at 37°C. Viral inoculum was then replaced by fresh cell medium. No additional medium renewal was allowed until analysis.

Cell death was determined 3 days after infection using the Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences). Briefly, cells were double-stained with annexinV-FITC and propidium iodide

for 15 min and analyzed by flow cytometry within 1 h. MV-specific cell death was then determined.

- Microscopy:

All observations were performed at the Cellular and Tissular Imaging Core Facility (MicroPICell, IFR26, Nantes, France). *In-vitro* observations of infected cells and time-lapse experiments were performed with a Leica DMI6000B station. Images were acquired with MetaMorph software. Immunohistochemical analyses were performed with a Leica DM2500 microscope coupled to a Leica DCF295 camera. Images were acquired with Leica Application Suite Version 3 software.

- *In-vivo* experiments:

Six-week-old, female *nude* mice were purchased from Centre d'Elevage Roger Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). Mice were inoculated subcutaneously with 10^6 tumor cells in the left flank. When tumor volumes reached approximately 150-200 mm³ for M6 and CaCo-2 or 100 mm³ for A549, they were injected intratumorally with either MV-eGFP (1.5×10^7 TCID₅₀) or saline buffer (PBS). Tumors were measured with a micro-caliper twice weekly. Tumor volumes were calculated using the $(\text{length}^2 \times \text{breadth})/2$ formula. Harvested tumors were fixed in 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA) for storage. All *in-vivo* experiments complied with European Union regulations on animal care and use in laboratories.

- Immunohistochemical stainings:

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 anti-active 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 DAB incubation, tumors were counterstained with hematoxylin.

- Statistical analyses:

For *in-vivo* studies comparing differences between two groups we used one-sided, unpaired Mann-Whitney *t*-tests. For *in-vivo* studies comparing more than three groups, we used one-sided analysis of variance with appropriate *post-hoc* testing. Differences were considered significant when * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. All data are presented as mean \pm SEM.

Acknowledgments:

This project is supported by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), La Ligue contre le Cancer and ARSMESO44. N.B. is personally supported by grants from the ARC. We thank Philippe Hulin, Myriam Robard and Cécile Deleine from the MicroPICell core facility for microscopic and immunohistochemical analyses, Virginie Maurier for animal experiments, Kate Vassaux for English editing.

The authors declare no competing financial interests.

References:

1. Parato KA, Senger D, Forsyth PA and Bell JC (2005). Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat Rev Cancer* **5**: 965-976.
2. Grote D, Russell SJ, Cornu TI, Cattaneo R, Vile R, Poland GA, *et al.* (2001). Live attenuated measles virus induces regression of human lymphoma xenografts in immunodeficient mice. *Blood* **97**: 3746-3754.
3. Lorence RM, Katubig BB, Reichard KW, Reyes HM, Phuangsab A, Sasseti MD, *et al.* (1994). Complete regression of human fibrosarcoma xenografts after local Newcastle disease virus therapy. *Cancer Res* **54**: 6017-6021.
4. Boisgerault N, Tangy F and Gregoire M (2010). New perspectives in cancer virotherapy: bringing the immune system into play. *Immunotherapy* **2**: 185-199.
5. Harrington KJ, Hingorani M, Tanay MA, Hickey J, Bhide SA, Clarke PM, *et al.* (2010). Phase I/II study of oncolytic HSV GM-CSF in combination with radiotherapy and cisplatin in untreated stage III/IV squamous cell cancer of the head and neck. *Clin Cancer Res* **16**: 4005-4015.
6. Senzer NN, Kaufman HL, Amatruda T, Nemunaitis M, Reid T, Daniels G, *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.
7. Garber K (2006). China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* **98**: 298-300.
8. Russell SJ (2002). RNA viruses as virotherapy agents. *Cancer Gene Ther* **9**: 961-966.
9. Gauthier A, Brandler S, Sapède-Peroz C, Boisgerault N, Tangy F and Gregoire M (2008). Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response. *Cancer Res* **68**: 4882-4892.
10. Dorig RE, Marcil A, Chopra A and Richardson CD (1993). The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* **75**: 295-305.
11. Nanche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B, Roubourdin-Combe C, *et al.* (1993). Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* **67**: 6025-6032.
12. Fishelson Z, Donin N, Zell S, Schultz S and Kirschfink M (2003). Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. *Mol Immunol* **40**: 109-123.
13. Peng KW, TenEyck CJ, Galanis E, Kalli KR, Hartmann LC and Russell SJ (2002). Intraperitoneal therapy of ovarian cancer using an engineered measles virus. *Cancer Res* **62**: 4656-4662.
14. Galanis E, Hartmann LC, Cliby WA, Long HJ, Peethambaram PP, Barrette BA, *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.
15. Takeda M, Tahara M, Hashiguchi T, Sato TA, Jinnouchi F, Ueki S, *et al.* (2007). A human lung carcinoma cell line supports efficient measles virus growth and syncytium formation via a SLAM- and CD46-independent mechanism. *J Virol* **81**: 12091-12096.
16. Leonard VH, Sinn PL, Hodge G, Miest T, Devaux P, Oezguen N, *et al.* (2008). 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* **118**: 2448-2458.
17. Ludlow M, Rennick LJ, Sarlang S, Skibinski G, McQuaid S, Moore T, *et al.* (2010). Wild-type measles virus infection of primary epithelial cells occurs via the basolateral

- surface without syncytium formation or release of infectious virus. *J Gen Virol* **91**: 971-979.
18. Garbe C, Eigentler TK, Keilholz U, Hauschild A and Kirkwood JM (2011). Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. *Oncologist* **16**: 5-24.
 19. Blehacz B and Russell SJ (2008). Measles virus as an oncolytic vector platform. *Curr Gene Ther* **8**: 162-175.
 20. Phuong LK, Allen C, Peng KW, Giannini C, Greiner S, TenEyck CJ, *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.
 21. Peng KW, Ahmann GJ, Pham L, Greipp PR, Cattaneo R and Russell SJ (2001). Systemic therapy of myeloma xenografts by an attenuated measles virus. *Blood* **98**: 2002-2007.
 22. McDonald CJ, Erlichman C, Ingle JN, Rosales GA, Allen C, Greiner SM, *et al.* (2006). A measles virus vaccine strain derivative as a novel oncolytic agent against breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **99**: 177-184.
 23. Msaouel P, Iankov ID, Allen C, Morris JC, von Messling V, Cattaneo R, *et al.* (2009). Engineered measles virus as a novel oncolytic therapy against prostate cancer. *Prostate* **69**: 82-91.
 24. Patel B, Dey A, Ghorani E, Kumar S, Malam Y, Rai L, *et al.* (2011). Differential Cytopathology and Kinetics of Measles Oncolysis in Two Primary B-cell Malignancies Provides Mechanistic Insights. *Mol Ther*
 25. Dhiman N, Jacobson RM and Poland GA (2004). Measles virus receptors: SLAM and CD46. *Rev Med Virol* **14**: 217-229.
 26. Anderson BD, Nakamura T, Russell SJ and Peng KW (2004). High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus. *Cancer Res* **64**: 4919-4926.
 27. Liu TC and Kirn D (2005). Viruses with deletions in antiapoptotic genes as potential oncolytic agents. *Oncogene* **24**: 6069-6079.
 28. Nguyen TL, Tumilasci VF, Singhroy D, Arguello M and Hiscott J (2009). The emergence of combinatorial strategies in the development of RNA oncolytic virus therapies. *Cell Microbiol* **11**: 889-897.
 29. Nguyen TL, Abdelbary H, Arguello M, Breitbach C, Leveille S, Diallo JS, *et al.* (2008). 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* **105**: 14981-14986.
 30. Otsuki A, Patel A, Kasai K, Suzuki M, Kurozumi K, Chiocca EA, *et al.* (2008). Histone deacetylase inhibitors augment antitumor efficacy of herpes-based oncolytic viruses. *Mol Ther* **16**: 1546-1555.
 31. Dai MH, Zamarin D, Gao SP, Chou TC, Gonzalez L, Lin SF, *et al.* (2010). Synergistic action of oncolytic herpes simplex virus and radiotherapy in pancreatic cancer cell lines. *Br J Surg* **97**: 1385-1394.
 32. Kuroda S, Fujiwara T, Shirakawa Y, Yamasaki Y, Yano S, Uno F, *et al.* (2010). Telomerase-dependent oncolytic adenovirus sensitizes human cancer cells to ionizing radiation via inhibition of DNA repair machinery. *Cancer Res* **70**: 9339-9348.
 33. Errington F, Steele L, Prestwich R, Harrington KJ, Pandha HS, Vidal L, *et al.* (2008). Reovirus activates human dendritic cells to promote innate antitumor immunity. *J Immunol* **180**: 6018-6026.

34. Fridlender ZG, Sun J, Singhal S, Kapoor V, Cheng G, Suzuki E, *et al.* (2010). Chemotherapy delivered after viral immunogene therapy augments antitumor efficacy via multiple immune-mediated mechanisms. *Mol Ther* **18**: 1947-1959.
35. Tesniere A, Schlemmer F, Boige V, Kepp O, Martins I, Ghiringhelli F, *et al.* (2010). Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene* **29**: 482-491.
36. Li H, Peng KW, Dingli D, Kratzke RA and 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.
37. Gueugnon F, Leclercq S, Blanquart C, Sagan C, Cellerin L, Padiou M, *et al.* (2011). Identification of novel markers for the diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Am J Pathol* **178**: 1033-1042.

2. Données supplémentaires

a. Expression de CD46 dans les lignées de mésothéliome

Lors de nos études précédentes, nous avons montré que la molécule CD46 était surexprimée par certaines cellules dérivées de mésothéliomes épithélioïdes (Gauvrit *et al.*, 2008). J'ai donc étudié de façon plus large l'expression de CD46 sur différentes lignées de mésothéliome issues de notre bio-collection (Figure 16).

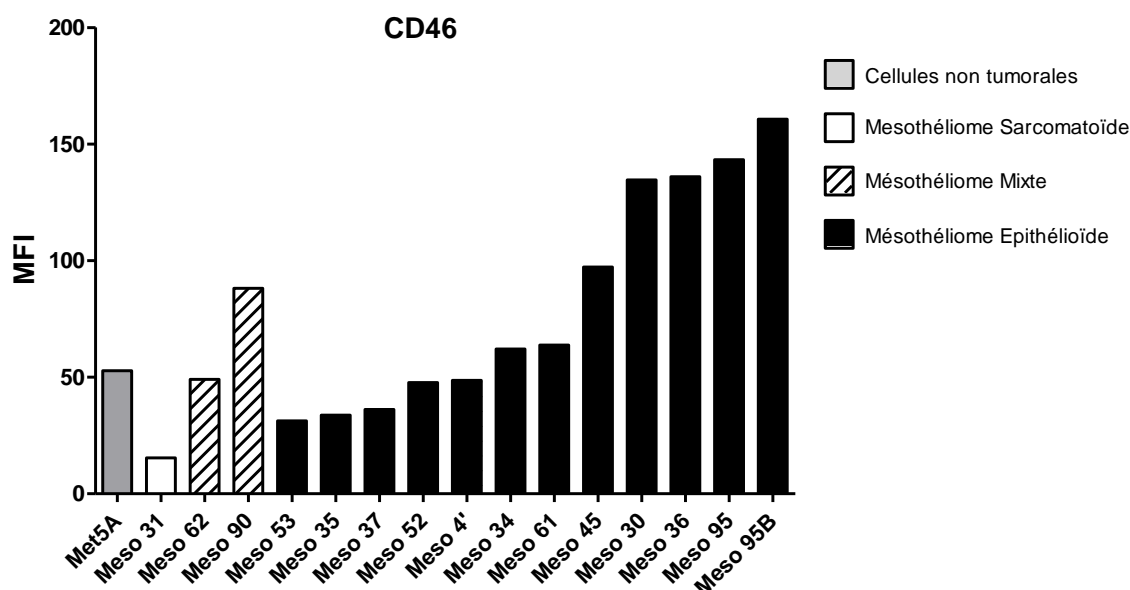


Figure 16 : Expression de CD46 par les cellules de mésothéliome

Les cellules de la lignée transformée non-maligne Met5A ou des lignées de mésothéliome pleural sarcomatoïde, mixte (biphasique) ou épithélioïde obtenues dans le laboratoire à partir de liquides pleuraux sont marquées avec un anticorps anti-CD46-FITC puis analysées par cytométrie en flux. Les résultats présentés sont exprimés en intensité de fluorescence médiane (MFI).

En accord avec nos résultats précédents, j'ai observé qu'une partie des lignées de mésothéliome épithélioïde surexpriment CD46 par rapport aux cellules non tumorales. Cependant, ces résultats confirment aussi que l'ensemble des lignées testées ne surexpriment pas CD46, comme cela a déjà été observé pour d'autres cancers (Fishelson *et al.*, 2003). De façon intéressante, la seule lignée de mésothéliome sarcomatoïde testée (Meso 31) n'exprime

que très faiblement le récepteur CD46. Il sera nécessaire de réaliser une étude plus large afin de déterminer si cette sous-expression de CD46 est commune aux mésothéliomes sarcomatoïdes ; ceci permettra notamment de définir si ce type de mésothéliome peut être une cible pertinente pour un traitement par la souche vaccinale du virus de la rougeole. Concernant les mésothéliomes mixtes, une des deux lignées testées (Meso 90) présente une surexpression de CD46 par rapport aux cellules normales transformées Met5A.

b. Rôle du CD46 dans l'infection par le virus MV oncolytique

Il a été montré dans plusieurs études précliniques que le récepteur CD46 jouait un rôle central dans l'infection des cellules tumorales par les souches atténuées du virus MV. Cependant, d'autres récepteurs (CD150/SLAM, DC-SIGN, epR, ...) sont aussi impliqués dans le processus d'infection du virus MV. Afin de mieux définir la fonction de CD46 dans la spécificité du virus MV pour les cellules tumorales, j'ai réalisé un blocage de ce récepteur puis analysé l'inhibition de l'infection virale (Figure 17).

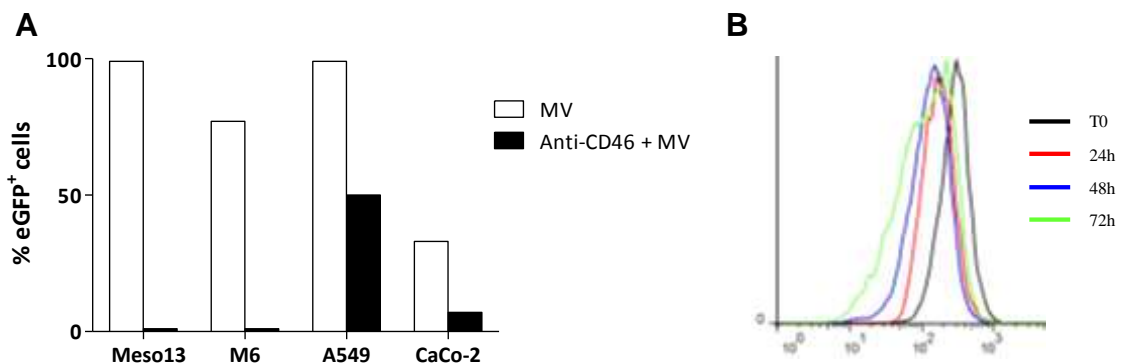


Figure 17 : Inhibition de l'infection par le blocage du récepteur CD46

(A) Les cellules sont incubées avec un anti-CD46 neutralisant (Hycult Biotech, 30µg/mL) pendant 1h à 37°C, lavées, puis infectées pendant 2h avec le virus MV-eGFP (MOI=1). Trois jours après infection, les cellules sont analysées par cytométrie en flux afin de déterminer le pourcentage de cellules infectées.

(B) A T0, puis 24h, 48h et 72h après incubation avec l'anti-CD46 neutralisant, les cellules Meso 13 sont récupérées pour marquage avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à la Cyanine-5 (Jackson ImmunoResearch, 1/200^e) puis analysées par cytométrie en flux.

Le blocage de CD46 abolit totalement l'infection des cellules Meso13 et M6 par le virus MV (Figure 17A). Au contraire, la neutralisation de CD46 ne bloque que partiellement l'infection des cellules d'adénocarcinome pulmonaire A549 et d'adénocarcinome colorectal CaCo-2 ; cette inhibition partielle de l'infection provoque ainsi un retard dans la propagation de l'infection (données non présentées). Parallèlement, j'ai vérifié que le blocage du récepteur CD46 était effectif pendant les 72 heures de l'infection (Figure 17B).

Concernant les lignées A549 et CaCo-2, plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'efficacité partielle du blocage de l'infection par l'anti-CD46, notamment (i) une non-saturation des sites CD46, (ii) un renouvellement rapide de CD46 à la surface de ces cellules ou (iii) l'expression de récepteurs alternatifs utilisés par le virus MV. Concernant cette dernière hypothèse, je n'ai pas pu mettre en évidence d'expression du récepteur CD150/SLAM sur les différentes lignées testées (données non présentées). Des données préliminaires obtenues par nos collaborateurs de l'équipe du Dr Tangy à l'Institut Pasteur suggèrent cependant l'implication potentielle d'un troisième récepteur.

c. Suivi de l'infection en microscopie Time-Lapse

Afin de caractériser l'effet cytopathique de la souche Schwarz du virus MV contre les cellules tumorales, j'ai suivi pendant 72 heures l'infection de cellules de mésothéliome en microscopie time-lapse (Figure 18).

L'infection par la souche Schwarz du virus MV se caractérise par la formation de cellules géantes multinucléées aussi appelées syncytia. Ces syncytia se forment dès 24 heures post-infection par fusion des cellules infectées avec les cellules voisines ; ils permettent notamment la propagation de l'infection virale et le recrutement de machineries cellulaires supplémentaires qui serviront à augmenter la production des particules virales. Au final, un seul syncytia peut ainsi être constitué de plus d'une centaine de cellules. Après 72 heures d'infection, la majorité des syncytia sont entrés en apoptose : ils se détachent du support puis libéreront leur contenu intracellulaire dans le milieu de culture s'ils ne sont pas pris en charge par des cellules phagocytaires.

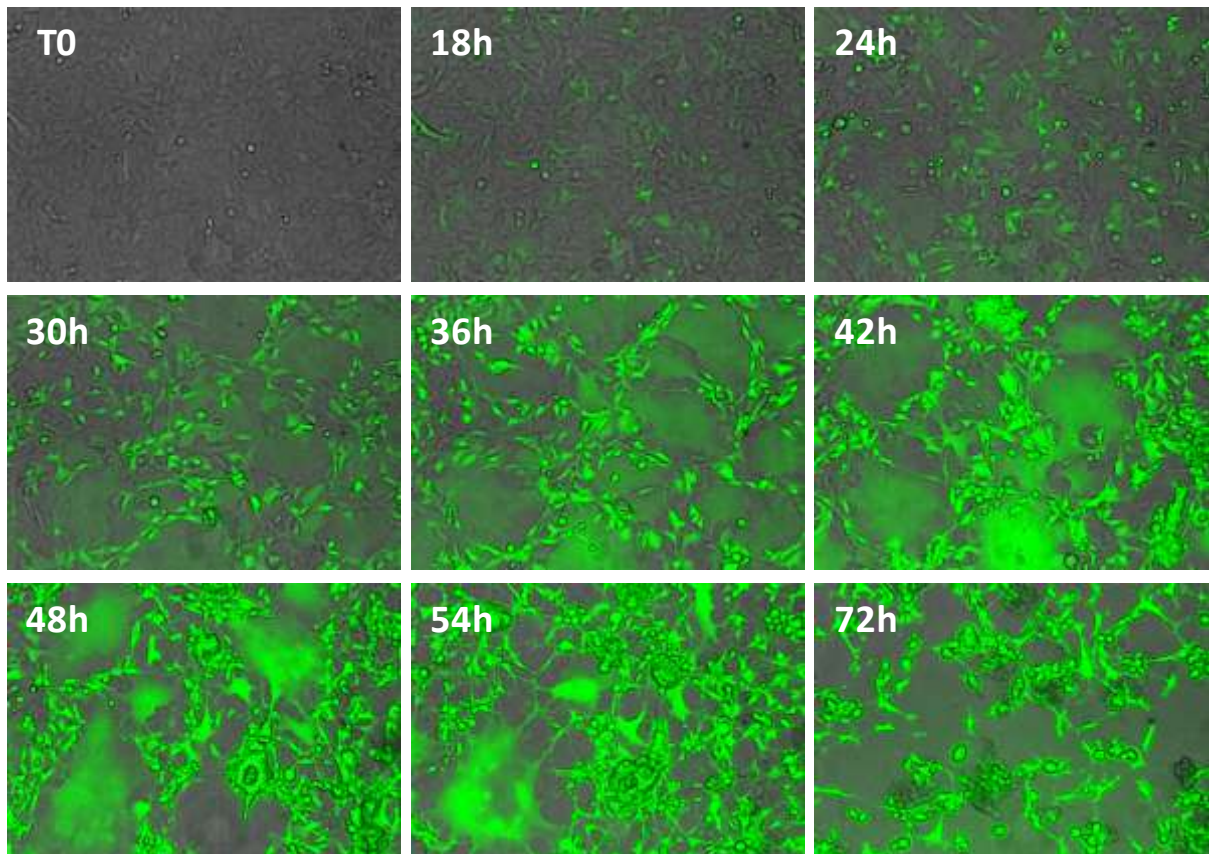


Figure 18 : Cinétique de l'infection par le virus MV

Les cellules de mésothéliome Meso13 sont infectées pendant 2h avec le virus MV-eGFP (MOI=1) puis observées pendant 72 heures en microscopie time-lapse (37°C, 5% de CO₂).

II. Utilisation d'un virus présentant des propriétés pro-apoptotiques augmentées

Malgré une forte efficacité d'infection, certaines cellules tumorales présentent des résistances à l'induction de la mort cellulaire par le virus MV. Le développement de virus présentant des propriétés pro-apoptotiques augmentées pourrait permettre de surmonter ce type de résistances et d'améliorer ainsi l'induction de la mort spécifique des cellules tumorales (*Liu et Kirn, 2005*).

La protéine C du virus de la rougeole est codée par le gène polycistronique P. Le rôle de cette protéine virale, qui est décrite comme un facteur de virulence pour MV, est encore mal connu. Elle participerait notamment à l'assemblage des particules virales, à l'expression des protéines du virus mais aussi au retardement de l'apoptose des cellules infectées afin d'établir une infection à long terme (*Takeuchi et al., 2005*). L'équipe du Dr Tangy à l'Institut Pasteur a ainsi développé un virus MV-Schwarz délété du gène codant pour la protéine C (MV-ΔC, Figure 19). Ce virus pourrait ainsi présenter une activité apoptotique supérieure au virus MV.



Figure 19 : *Modification de la souche vaccinale du virus MV par délétion du gène codant pour la protéine C (MV-ΔC)*

Le gène C est codé par le gène polycistronique P qui code aussi pour la phosphoprotéine P et le facteur de virulence V. L'inhibition de la synthèse de la protéine C se fait par mutation du codon d'initiation AUG au début de sa séquence codante. (d'après Patterson et al., 2000)

J'ai étudié les capacités d'infection de ce nouveau virus MV- Δ C vis-à-vis de cellules déjà efficacement infectées par la souche vaccinale non modifiée du virus MV et envers des cellules résistantes à l'infection (Figure 20). Le virus MV- Δ C est effectivement capable d'induire plus efficacement que le virus MV la mort de cellules telles que Meso 13 et M18 dès 48h post-infection (Figure 20A).

Les cellules de cancer du poumon A549 montrent une certaine résistance à l'induction de la mort par le virus MV malgré une infection efficace (voir Article ci-dessus). Cependant, à 72h post-infection, le virus MV- Δ C induit lui une forte apoptose de ces cellules par rapport au virus MV.

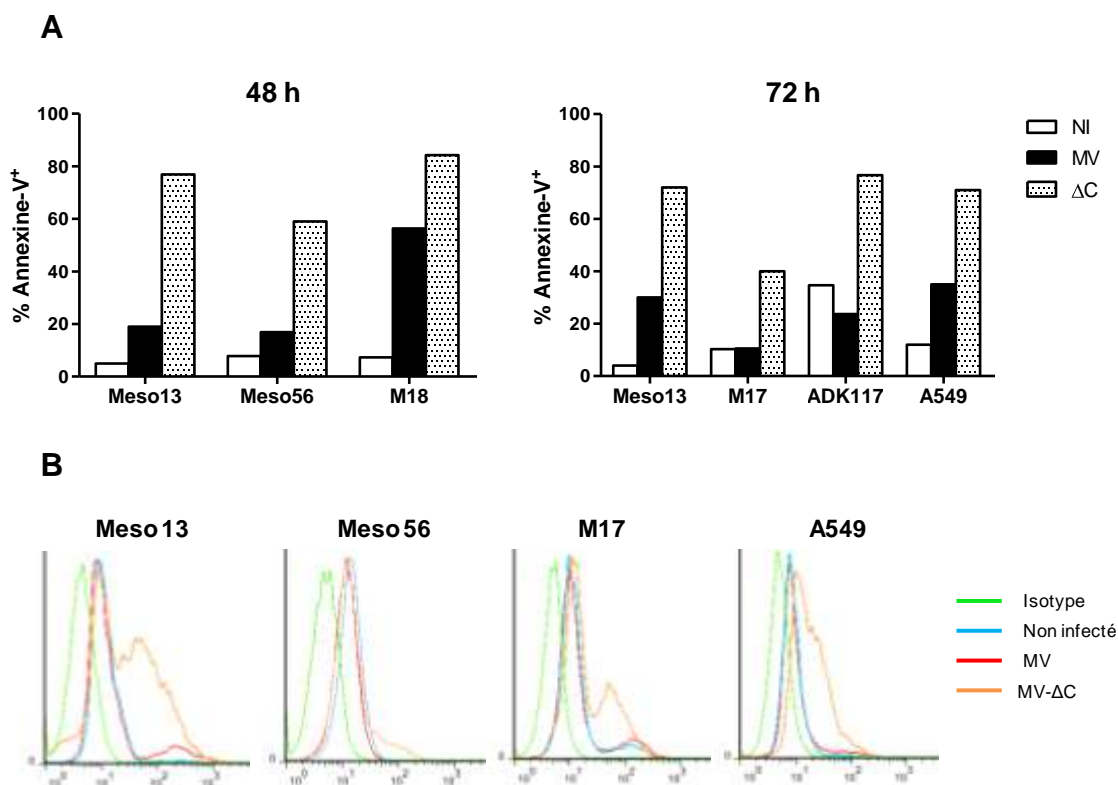


Figure 20 : Induction de la mort cellulaire par le virus MV- Δ C

(A) Les cellules tumorales sont infectées par le virus MV ou le virus MV- Δ C (MOI=1, 2h), marquées (Annexine-V-FITC / iodure de propidium) à 48h ou 72h après infection, puis analysées par cytométrie en flux.

(B) Les cellules tumorales infectées et non infectées sont marquées à 48h ou 72h post-infection par un anticorps anti-caspase-3 activée (BD Biosciences) puis analysées par cytométrie en flux.

De façon plus surprenante, les cellules faiblement infectées (Meso56 et ADK117), voire non infectées (M17), par le virus vaccinal MV présentent en revanche une importante induction de la mort cellulaire après l'infection par MV- Δ C. Ces résultats nous interrogent sur le mécanisme d'infection par le virus MV- Δ C. En effet, il nous faudra déterminer quel est l'impact de la délétion du gène C sur la spécificité du virus MV- Δ C vis-à-vis des cellules tumorales, aussi bien au niveau du ciblage des récepteurs d'entrée que des mécanismes intracellulaires. On peut en effet suggérer que l'induction précoce de la mort par le virus MV- Δ C permette une transmission plus rapide des nouvelles particules aux cellules voisines. Cette propagation rapide de l'infection serait alors associée à une proportion plus importante de cellules en apoptose à un temps donné.

Des travaux précédents se sont intéressés à la nature de la mort cellulaire induite par un virus MV déficient pour la protéine C (*Takeuchi et al., 2005*). J'ai donc analysé l'activation de la caspase-3 dans les cellules infectées par MV- Δ C en comparaison de MV (Figure 20B). Dans les cellules Meso 13, le virus MV n'induit une faible activation de la caspase-3 que dans une fraction des cellules infectées (12,6 %), tandis que le virus MV- Δ C provoque lui une activation de cette caspase dans 38,2 % des cellules. Cette activation de la caspase-3 par le virus MV- Δ C est aussi observée dans les cellules M17 (30,2 %) et A549 (21,8 %), ce qui est cohérent avec les marquages Annexine-V/IP précédents (Figure 20A). Au contraire, le virus MV non modifié n'induit l'activation de la caspase-3 que pour respectivement 14,9 % et 7,35 % de ces cellules. Pour Meso 56, l'activation de la caspase-3 est plus faible avec 8,37 % de cellules positives après infection par le virus MV- Δ C contre 0,36 % avec le virus MV.

III. Activation de la réponse anti-tumorale

1. Maturation des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) jouent un rôle central dans la génération des réponses lymphocytaires T spécifiques dirigées contre les antigènes tumoraux. Nous avons ainsi montré que les cellules de mésothéliome infectées étaient capables d'induire la maturation spontanée de DC (*Gauvrit et al., 2008*). J'ai confirmé ces données sur d'autres lignées tumorales et sur différents donneurs sains de monocytes (Figure 21).

Les DC ayant phagocyté des cellules de mésothéliome (Meso 11 et Meso 13) infectées présentent un phénotype mature comme le montre la surexpression des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 et du marqueur de maturation CD83 par rapport aux cellules immatures (DCi). Les molécules de présentation antigénique HLA-A,B,C (CMH I) et HLA-DR (CMH II) sont elles seulement légèrement surexprimées dans ces conditions, alors que la molécule de costimulation CD40 ne montre pas de variation de son expression en comparaison des contrôle de maturation IFN- α /PolyI:C et TNF- α /PolyI:C. À l'inverse des cellules tumorales infectées, des cellules de mésothéliome induites en apoptose par une exposition aux rayons UV-B, soit une mort cellulaire « non immunogène », n'induisent pas de maturation des DCi suite à leur phagocytose.

Ces résultats confirment que l'infection de cellules tumorales par le virus MV oncolytique constitue un environnement favorable à l'activation des DCi. Afin de mieux caractériser l'impact des facteurs cellulaires dans la maturation des DCi, j'ai analysé les propriétés immuno-stimulatrices des différentes fractions des cellules infectées par MV. Pour cela, j'ai tout d'abord séparé les surnageants et les culots des cellules de mésothéliome Meso 13 infectées par MV (Figure 22). J'ai montré que le « culot » seul induisait une meilleure activation des DC que la fraction « surnageant », ainsi que de la totalité de l'extrait « culot + surnageant ». Mes résultats suggèrent tout de même que le surnageant contient des facteurs immuno-activateurs puisque les surnageants seuls permettent d'induire une maturation des DC plus efficace qu'avec les cellules tumorales exposées aux UV-B. L'effet inhibiteur du surnageant s'expliquerait lui notamment par la production de cytokines immuno-modulatrices telles que l'IL-10 ou le TGF- β par les cellules tumorales.

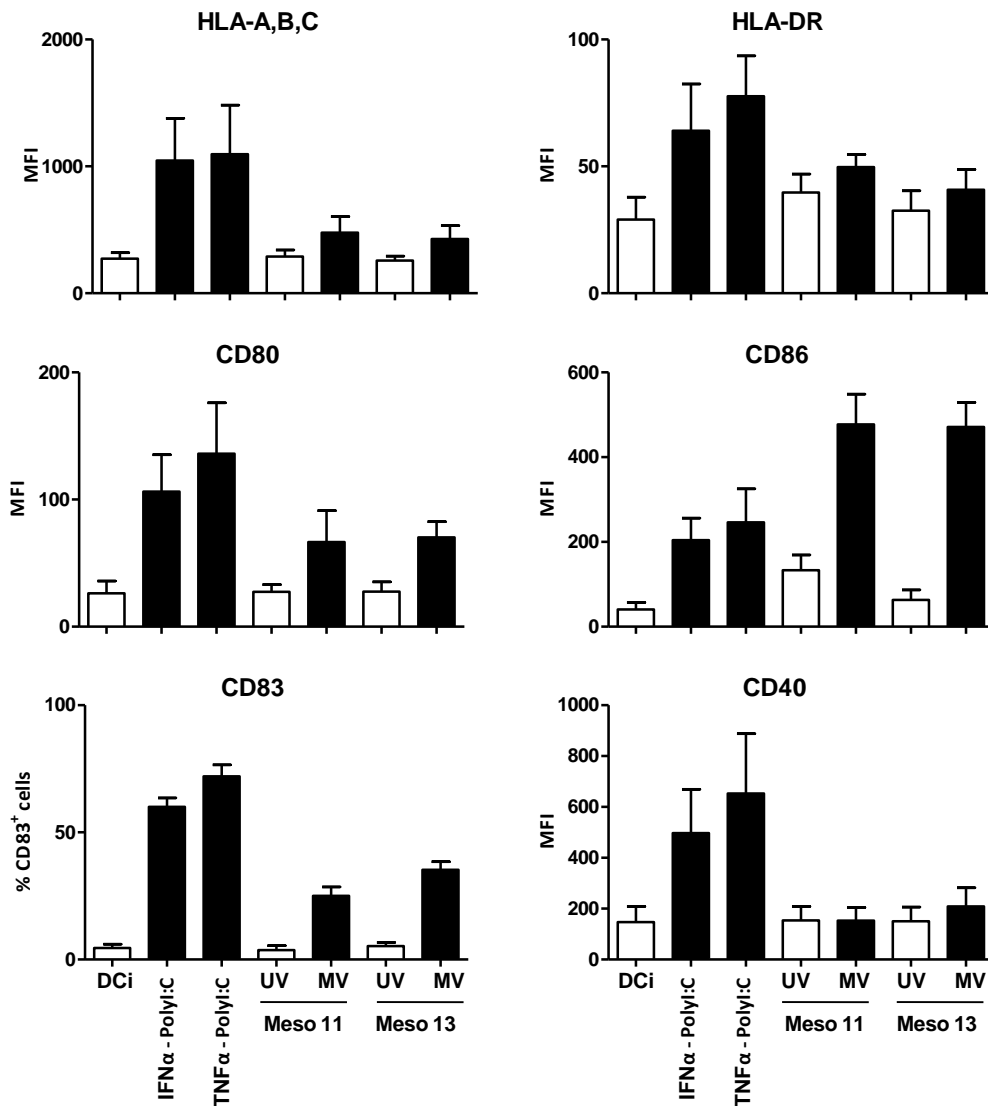


Figure 21 : Maturation des DC après phagocytose de cellules de mésothéliome infectées

Les DC différenciées à partir de monocytes du sang pendant 5 jours en présence de GM-CSF (1000 U/mL) et d'IL-4 (200 U/mL) sont incubées pendant 18h en présence de cellules de mésothéliome traitées aux ultraviolets (312 nm, 25 kJ/m², 24h post-irradiation) ou infectées par MV (MOI=1, 72h post-infection). Les contrôles positifs de maturation consistent en DC immatures (DCi) et en DC traitées avec de l'IFN- α (500 U/mL) + PolyI:C (50 μ g/mL) ou TNF- α (20 ng/mL) + PolyI:C. Les DC sont marquées par anticorps puis analysées par cytométrie en flux.

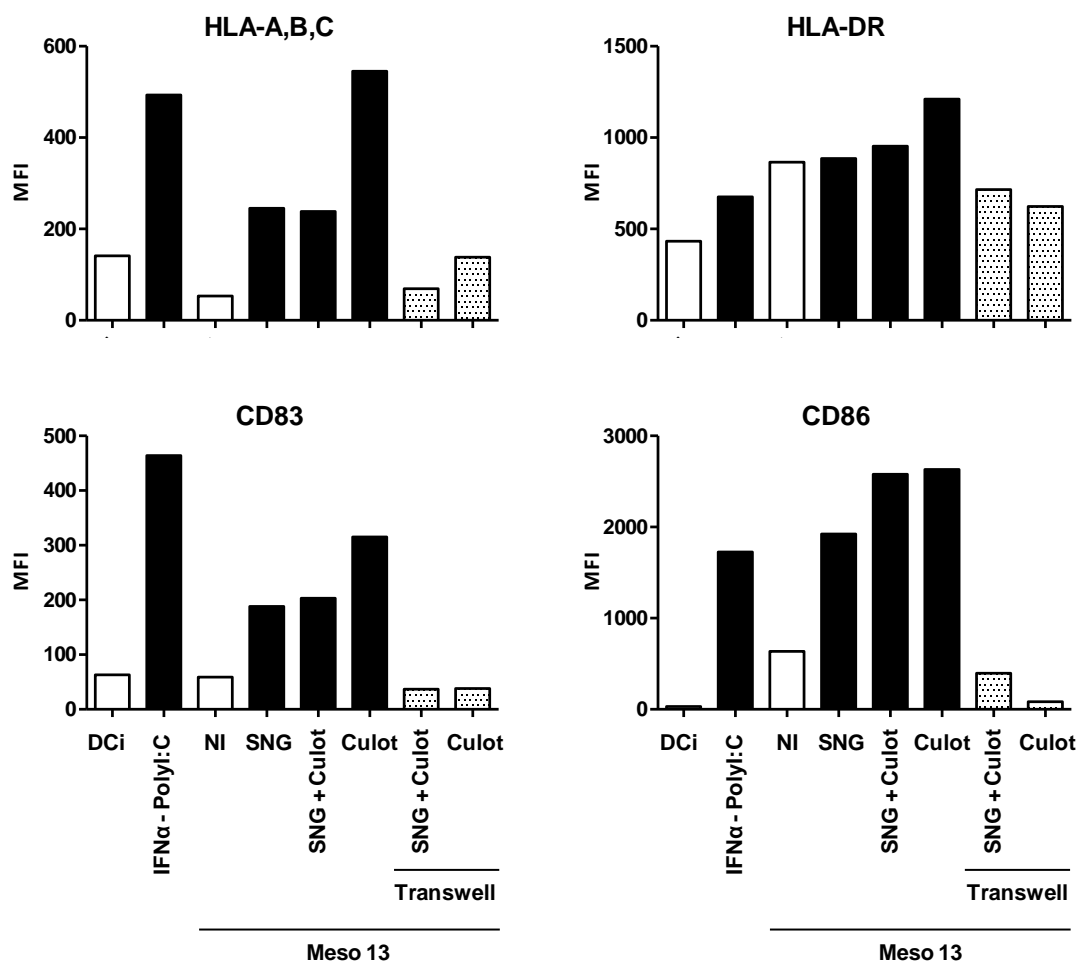


Figure 22 : Identification de la fraction cellulaire nécessaire à la maturation des DC

Les DC dérivées de monocytes sont incubées pendant 18h en présence de surnageants (SNG) et/ou de culots de cellules Meso 13 infectées (MOI=1, 72h post-infection) ou non infectées (NI). Elles sont ensuite marquées par anticorps et analysées par cytométrie en flux. Pour les expériences en « transwell » (pores de 0,4 µm), les DC sont placées dans la chambre inférieure et les fractions de cellules tumorales infectées dans la chambre supérieure afin d'éviter tout contact direct. Les DC sont récupérées après 18h de co-culture puis analysées comme décrit ci-dessus.

Afin de confirmer les propriétés immuno-activatrices de la fraction cellulaire dans la maturation des DCi induite par les cellules tumorales apoptotiques infectées, j'ai réalisé le même type d'expérience en utilisant des inserts de « transwell » avec des pores de 0,4 µm (Figure 22). Ces membranes permettent de séparer les DC des extraits de cellules tumorales

infectées afin d'éviter tout contact cellulaire direct. En revanche, ces membranes autorisent le passage de molécules solubles. La séparation des deux types cellulaires par les transwells inhibe totalement la maturation spontanée des DC induite par les cellules tumorales infectées. Cela confirme l'importance d'un contact direct entre les DCi et les corps apoptotiques des cellules infectées. Les transwells semblent aussi inhiber la faible maturation induite par les surnageants des cellules infectées, ce qui pourrait s'expliquer par la présence de fragments cellulaires dans les surnageants utilisés dans les expériences précédentes. L'ensemble de ces résultats suggère donc que la fraction cellulaire des cellules tumorales infectées contient des facteurs de danger endogènes importants impliqués dans la maturation spontanée des DC.

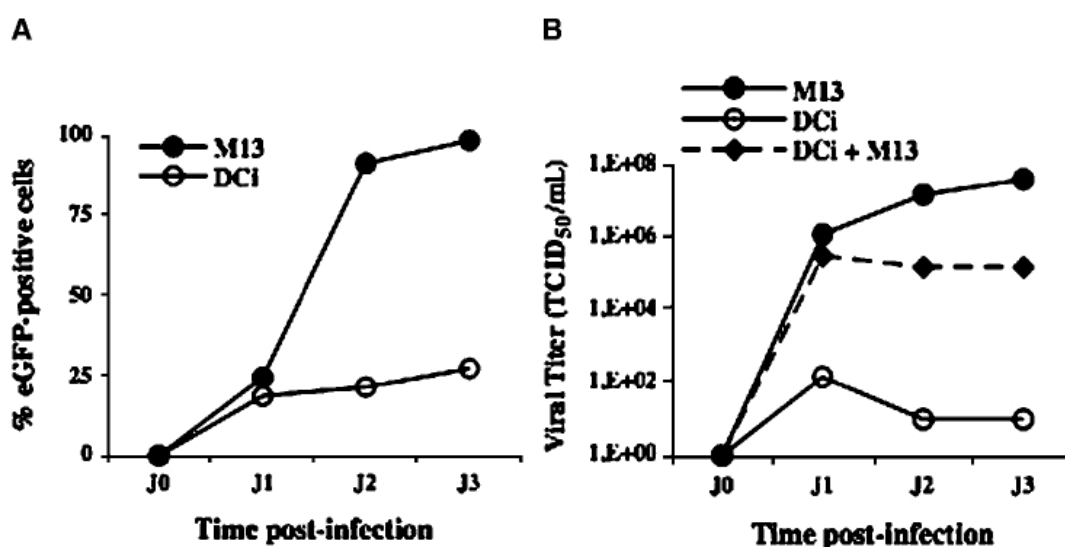


Figure 23 : Infection des DC par la souche vaccinale du virus MV

(A) Les cellules dendritiques immatures (DCi) et les cellules Meso 13 (M13) sont infectées avec le virus MV-eGFP (MOI=1, 2h). Les pourcentages d'infection sont ensuite déterminés à 24, 48 et 72h post-infection par cytométrie en flux.

(B) Les DCi et les cellules Meso 13 sont infectées comme décrit en A. Des DCi sont aussi incubées pendant 18h en présence de cellules Meso 13 prises à 72h post-infection. Les surnageants et les culots des DCi, des cellules Meso 13 et des co-cultures DCi/Meso 13 sont récupérés à 24, 48 et 72h post-infection afin de déterminer la quantité de particules virales dans la culture. Le titre viral est déterminé par infection de cellules Vero avec les différents extraits.

Le souche sauvage du virus de la rougeole est connue pour son tropisme envers les DC, par le ciblage du récepteur CD150/SLAM, ainsi que pour ses propriétés immuno-modulatrices (*Schneider-Schaulies et al., 2002*). Afin de vérifier l'impact de l'infection directe des DC par la souche vaccinale du virus MV, j'ai suivi l'évolution de cette infection pendant 72 heures (Figure 23). Les DCi sont effectivement infectées par le virus atténué MV-eGFP, mais de façon moins efficace que les cellules tumorales. En effet, la proportion de cellules infectées n'évolue que très peu après les premières 24 heures (Figure 23A).

Ces résultats sont confirmés par la cinétique montrant l'évolution du titre viral dans les 72 heures suivant l'infection (Figure 23B). Alors que le titre viral croît de façon exponentielle dans les cellules tumorales Meso 13 pour atteindre environ 10^8 TCID₅₀/mL, les DCi montrent une baisse puis une stagnation du nombre de particules virales produites après 24h d'infection (10 TCID₅₀/mL). Cela confirme que la souche vaccinale du virus MV ne se réplique pas efficacement dans les DC par rapport aux cellules tumorales. Lorsque les cellules Meso 13 infectées sont phagocytées par les DCi, le titre viral diminue aussi après 24 heures et apparaît beaucoup plus faible (5×10^5 TCID₅₀/mL) que pour les cellules Meso 13 infectées seules.

2. Activation des réponses lymphocytaires T

Les cellules tumorales infectées par MV induisent donc la maturation des DCi du point de vue phénotypique. Afin de confirmer la maturation fonctionnelle des DC dans ces conditions, j'ai aussi étudié leurs capacités à induire l'activation de lymphocytes T.

Pour tester ces capacités de stimulation, j'ai tout d'abord étudié la capacité de ces DC à induire la prolifération de lymphocytes T CD4 et CD8 autologues en menant des expériences d'incorporation de thymidine-³H (Figure 24). J'ai observé que les DC maturées spontanément en présence de cellules tumorales infectées par MV étaient effectivement capables d'induire la prolifération de lymphocytes T CD4 et CD8. Au contraire, la phagocytose de cellules tumorales induites en apoptose par exposition aux ultraviolets, une mort considérée comme « non immunogène », n'est elle pas capable d'induire cette prolifération : l'incorporation de thymidine-³H dans cette condition est en effet équivalente à celle observée avec les DCi.

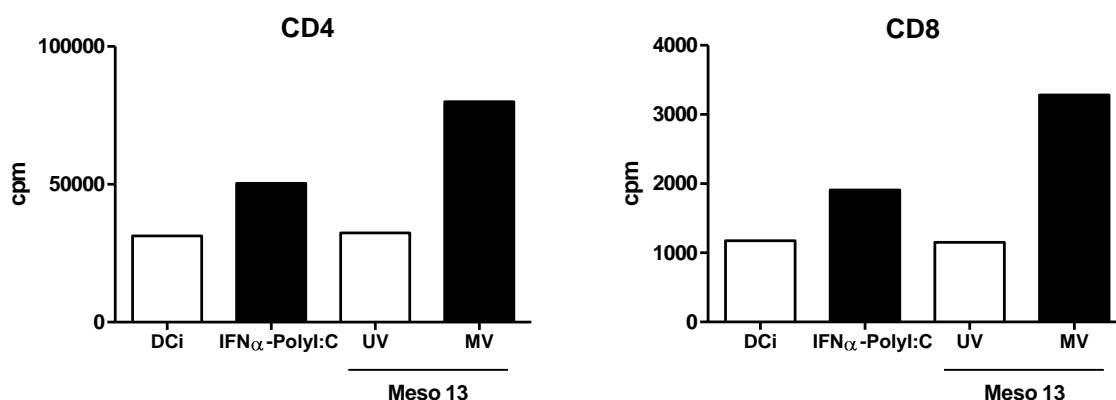


Figure 24 : Etude de la prolifération de lymphocytes T CD4 et CD8 autologues

100 000 lymphocytes T CD4 ou CD8 sont incubés pendant 6 jours avec 10 000 DC immatures (DCi) ou maturées en présence d'IFN- α /PolyI:C, de cellules Meso 13 traitées aux UV-B (25 kJ/m², 24h après irradiation) ou de Meso 13 infectées par MV (MOI=1, 2h, 72h après infection). A J5, les lymphocytes sont incubés en présence de thymidine-³H (1 μ Ci / condition) pendant 16h puis analysés avec un compteur de rayonnements β afin de déterminer la prolifération.

cpm : coups par minute

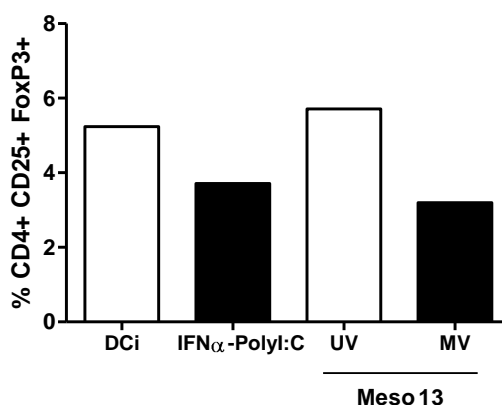


Figure 25 : Induction de lymphocytes T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ par les DC

100 000 lymphocytes T CD4 sont incubés en présence de 10 000 DC autologues pendant 13 jours. De l'IL-2 (20 U/mL) est ajouté à J7. À J13, les lymphocytes sont récupérés, marqués puis analysés par cytométrie en flux afin de déterminer la proportion de cellules CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ dans la population CD4 totale.

Parallèlement aux tests d'activation des lymphocytes T, j'ai déterminé la capacité des DC à induire ou à inhiber la polarisation de lymphocytes T CD4 autologues vers un phénotype régulateur CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Figure 25). Les DC ayant phagocyté des cellules tumorales UV induisent une proportion de cellules CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (5,71 %) équivalente aux DCi (5,24 %). La maturation des DC par un cocktail IFN- α /PolyI:C (3,71 %) ou par des cellules tumorales MV (3,20 %) permet en revanche de diminuer la proportion de CD4 présentant un phénotype régulateur au sein de la population T CD4 totale.

Afin de tester les propriétés de présentation croisée des DC ayant phagocyté des cellules de mésothéliome infectées par MV, j'ai ensuite étudié leur capacité à activer un clone CD8 spécifique de l'antigène de tumeur MUC-1 (Mucin-1). MUC-1 est surexprimé dans plusieurs types de cancers et notamment dans le mésothéliome.

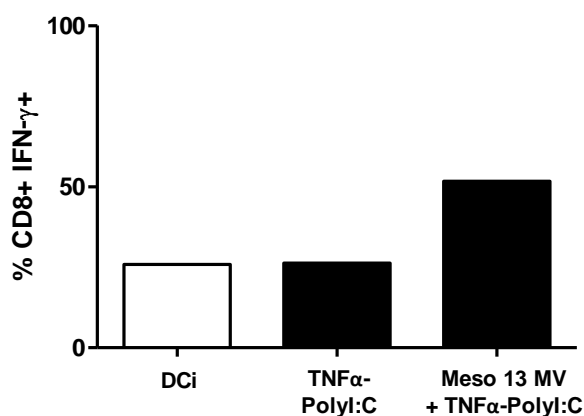


Figure 26 : *Activation d'un clone CD8 spécifique de l'antigène de tumeur MUC-1*
 Les DCi, les DC matures (TNF- α /PolyI:C) et les DC ayant phagocyté des cellules Meso 13 infectées par MV (MOI=1, 72h post-infection) sont incubées avec des clones T CD8 spécifiques de MUC-1 (ratio 1:10) pendant 6h en présence de Bréfeldine-A pour bloquer la sécrétion de cytokines. Les lymphocytes sont ensuite marqués par un anticorps anti-CD8-APC (extracellulaire) et un anticorps anti-IFN- γ -PE (intracellulaire). Les pourcentages de clones activés CD8⁺IFN- γ ⁺ sont ensuite déterminés par cytométrie en flux.

Résultats

Les DCi et les DC maturées en présence de TNF- α /PolyI:C induisent l'activation d'environ 25% des clones anti-MUC-1 (Figure 26). Ces résultats sont corrélés à l'expression de MUC-1 par les DC matures et immatures : les peptides dérivés de cet antigène sont normalement présentés sur le CMH I des DC par la voie de présentation classique des protéines endogènes. Les DC ayant phagocyté des cellules de mésothéliome infectées par MV montrent une activation plus importante des clones T CD8 avec plus de 50% de lymphocytes produisant de l'IFN- γ . Ces résultats préliminaires suggèrent que les DC sont capables de présenter sur leur CMH de classe I des antigènes MUC-1 dérivés des cellules Meso 13 par la voie de présentation croisée. Ces données sont en accord avec les travaux précédents publiés par notre équipe (*Gauvrit et al., 2008*) puisque l'on avait déjà montré que des DC ayant phagocytés des cellules de mésothéliome était capables d'induire la prolifération de lymphocytes T spécifique de l'antigène de tumeur mésothéline au sein d'une population totale de T CD8 autologues.

IV. Induction d'une mort immunogène par le virus de la rougeole

L'infection des cellules tumorales par les virus oncolytiques peut provoquer un stress cellulaire (*Fabián et al., 2007*). L'infection, mais aussi la mort cellulaire induite par ces virus, provoque ainsi la production ou la libération de molécules présentant des propriétés immunogènes (*Wang et al., 2006b*). Ces signaux de danger endogènes issus des cellules infectées peuvent en effet être reconnus par les cellules de l'immunité et permettre le déclenchement de réponses adaptatives. Les DC reconnaissent ces signaux de danger grâce à l'expression de différents récepteurs (PRR). Elles permettent ainsi au système immunitaire d'agir en synergie avec l'activité oncolytique directe des virus en activant une réponse lymphocytaire spécifique des antigènes de tumeurs.

Mes résultats précédents ont montré que l'infection de cellules tumorales par la souche vaccinale oncolytique du virus MV permettait la maturation de DC et l'activation de lymphocytes T autologues. Afin de caractériser le mécanisme par lequel ces cellules infectées induisent l'activation du système immunitaire, j'ai étudié l'expression, la modification et/ou la libération de différents facteurs cellulaires connus pour leur implication dans l'immunogénicité de la mort cellulaire. Les protéines de la famille HSP, la calréticuline, HMGB-1, l'acide urique ou l'ATP, mais aussi certains facteurs immuno-modulateurs produits par les cellules tumorales peuvent ainsi intervenir dans l'activation ou l'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale.

1. Protéines de réponse au choc thermique

Les protéines de réponse au choc thermique de la famille HSP sont impliquées dans la réponse à différents types de stress cellulaires. Certaines de ces molécules, en particulier Hsp70, Hsp90 et Gp96, présentent des propriétés immunogènes en participant à l'adressage de peptides antigéniques vers la voie de présentation croisée. J'ai donc étudié l'influence de l'infection de cellules tumorales par le virus oncolytique MV sur l'expression des protéines HSP par ces cellules.

Premièrement, j'ai analysé l'expression des protéines Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90 et Gp96 72 heures après l'infection de cellules de mésothéliome Meso 11 et Meso 13 par le virus MV (Figure 27). J'ai ainsi montré que l'infection par MV provoquait une augmentation de l'expression de l'ensemble de ces protéines. Cette surexpression commence dès 24h après le début de l'infection pour atteindre un pic à 72h (données non présentées). Le déclenchement de la mort cellulaire provoque ensuite une perte d'expression de ces protéines.

Le stress induit par l'infection virale provoque notamment une forte surexpression de Hsp70 par les cellules de mésothéliome infectées. L'induction des protéines HSP suite à une infection virale a par ailleurs été démontrée comme un déterminant important de l'immunogénicité de la mort cellulaire (Melcher et al., 1998).

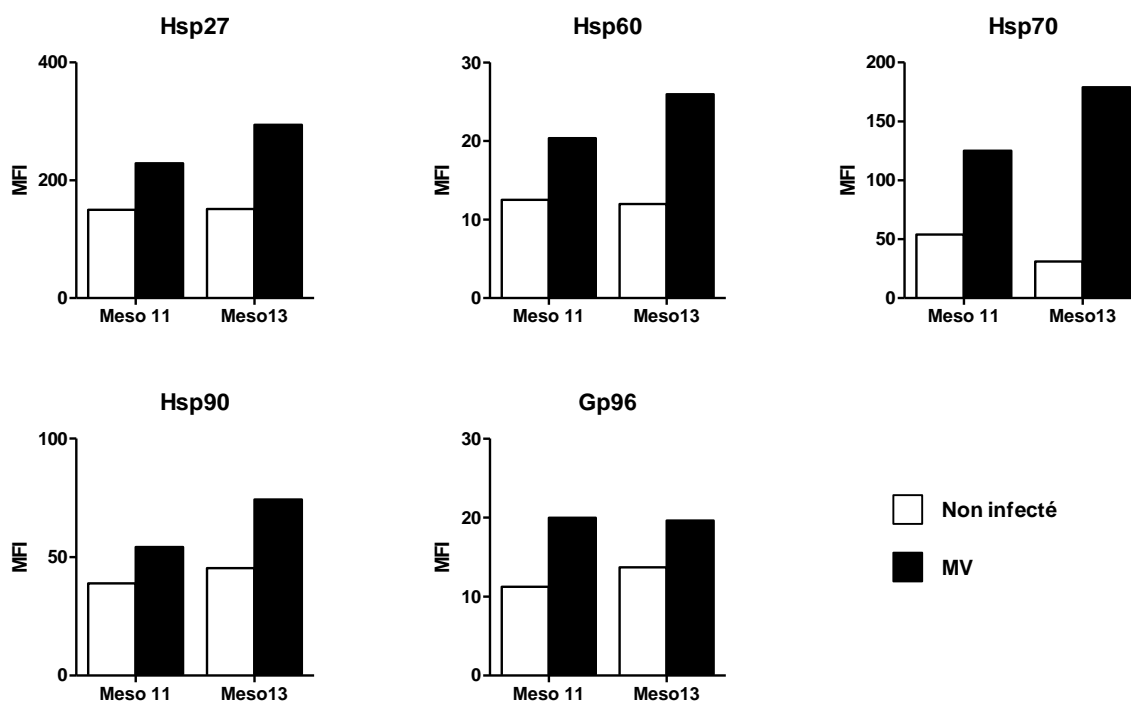


Figure 27 : Expression intracellulaire des protéines HSP 72 heures après infection par le virus MV

Les cellules tumorales sont infectées par le virus MV (MOI=1). Soixante-douze heures après infection, l'expression intracellulaire des protéines HSP est déterminée par marquage avec des anticorps anti-Hsp27, anti-Hsp60, anti-Hsp70, anti-Hsp90 ou anti-Gp96 (Stressgen) puis avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à la Cyanine-5 (Jackson ImmunoResearch). Les cellules non infectées sont cultivées pendant 72h dans les mêmes conditions et marquées selon le même protocole. Les cellules sont ensuite analysées par cytométrie en flux.

Afin de confirmer les résultats obtenus sur les cellules de mésothéliome infectées, j'ai étudié de façon plus large l'impact de l'infection sur l'expression de la protéine de stress Hsp70 par différentes lignées de mélanome, d'adénocarcinome pulmonaire et d'adénocarcinome colorectal (Figure 28).

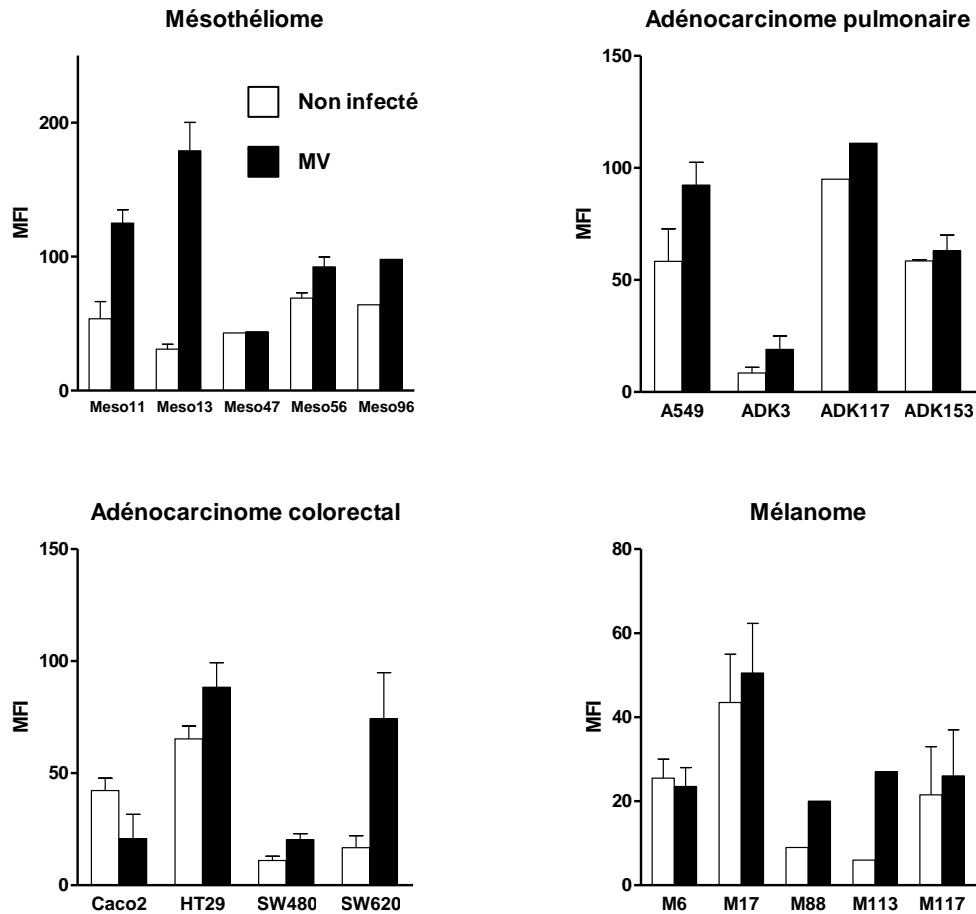


Figure 28 : Expression de la protéine Hsp70 après infection par le virus MV

L'expression de la protéine Hsp70 dans les cellules tumorales non infectées et les cellules infectées (72h post-infection) est déterminée par marquage intracellulaire et cytométrie en flux.

Mes résultats montrent que l'infection par le virus MV induit effectivement une surexpression de Hsp70 dans certaines cellules tumorales efficacement infectées dont Meso 11, Meso 13 et Meso96 (mésothéliome), A549 (poumon), HT29 et SW620 (côlon), et M88 et M113 (mélanome). Cependant, Meso 47 (mésothéliome), ADK153 (poumon), CaCo-2

(côlon) ou M6 (mélanome) ne présentent pas de surexpression de Hsp70 malgré une forte infection par MV. De façon générale, l'induction d'expression de Hsp70 semble moins importante dans les cellules dérivées de mélanome et de cancers du côlon ou du poumon que dans les cellules Meso 11 et Meso 13.

La présence de protéines Hsp70 sur la membrane plasmique des cellules infectées intervient dans leur reconnaissance par les CPA et les cellules effectrices de l'immunité (Oglesbee *et al.*, 2002). Afin de déterminer le rôle potentiel de cette protéine dans la maturation des DC suite à l'infection, j'ai donc aussi analysé son expression sur la surface des cellules infectées par les virus MV et MV- Δ C (Figure 29). Alors que le virus MV n'induit pas la translocation de Hsp70 vers la surface des cellules Meso 13 malgré leur forte infection, le virus MV- Δ C induit lui en revanche l'exposition de Hsp70 à l'extérieur de la cellule. Le virus MV- Δ C, montré ci-dessus comme capable d'infecter et d'induire la mort des cellules Meso 56, M17 et A549, provoque aussi une forte augmentation de la quantité de Hsp70 membranaire sur ces cellules par rapport aux cellules non infectées ou infectées par le virus MV.

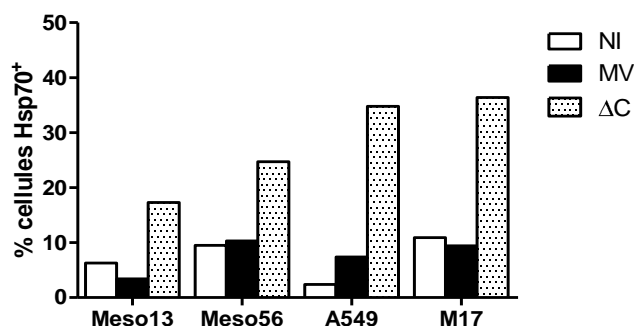


Figure 29 : Exposition de la protéine Hsp70 sur la surface cellulaire

L'expression membranaire de la protéine Hsp70 est déterminée à 48h (Meso 13 et Meso 56) ou 72h (A549 et M17) après infection, par marquage extracellulaire et cytométrie en flux.

2. Calréticuline

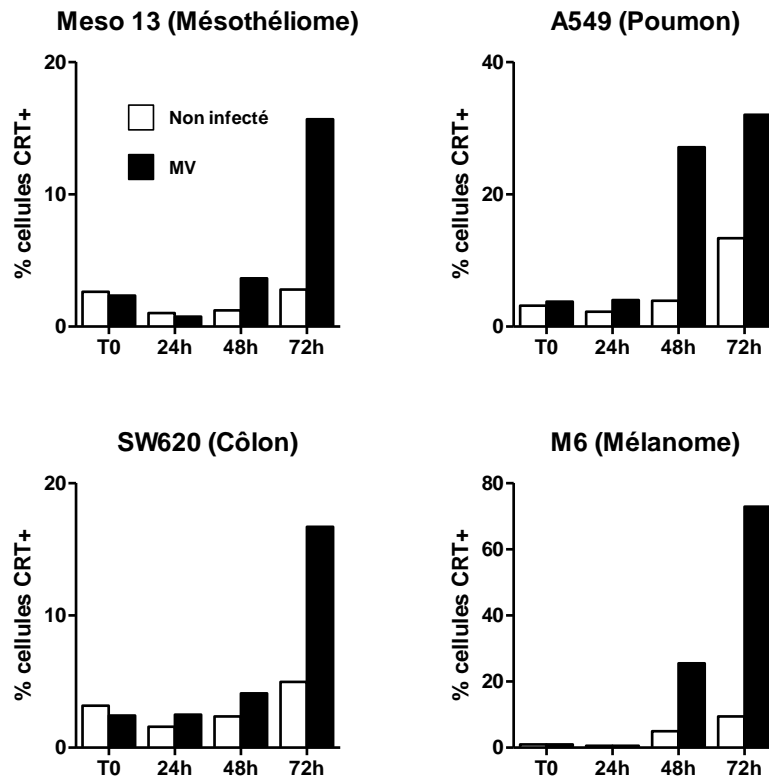
La calréticuline est une protéine essentielle du réticulum endoplasmique, pouvant être relocalisée vers la surface externe de la membrane plasmique lors de stress cellulaires (*Heal et McGivan, 1998*). Cette exposition à la surface de la cellule permet notamment la phagocytose des cellules apoptotiques par les CPA (*Ogden et al., 2001*). Récemment, certains travaux ont émis l'hypothèse que la présentation de calréticuline à la surface des cellules dictait l'immunogénicité de leur mort cellulaire (*Obeid et al., 2007a*).

J'ai donc étudié l'impact de l'infection de cellules tumorales par le virus oncolytique MV sur la translocation de calréticuline vers la surface cellulaire. Pour cela, j'ai analysé par marquage extracellulaire la présence de calréticuline à la surface des cellules infectées en caractérisant sa cinétique d'exposition (Figure 30).

Les quatre types de cellules tumorales testées, à savoir Meso 13 (mésothéliome), A549 (poumon), SW620 (côlon) et M6 (mélanome), présentent une augmentation de la translocation de calréticuline vers la face externe de la membrane plasmique suite à l'infection par MV (Figure 30A). L'exposition de la calréticuline à la surface augmente parallèlement à l'évolution de l'infection ; à 72h post-infection, la forte proportion de cellules positives pour le marquage externe de la calréticuline est ainsi corrélée à la forte induction de la mort cellulaire (voir Article ci-dessus). Une petite fraction des cellules A549 et SW620 non infectées présentent aussi un marquage positif pour la calréticuline externe ; à forte confluence, une partie des cellules nécrose, créant ainsi un contexte « immunogène ».

Afin de caractériser plus précisément la cinétique de translocation de la calréticuline dans les cellules infectées par MV, j'ai suivi pendant 60 heures l'évolution du marquage à la surface des cellules de la lignée de mélanome M6 (Figure 30B). L'apparition de cellules positives pour le marquage calréticuline se fait en trois vagues successives (notées 1, 2 et 3 sur la figure) qui corrèlent avec les différentes « vagues » d'infection par le virus MV oncolytique (données non présentées) ; la calréticuline est ainsi exposée à la surface des cellules environ 24 heures après l'infection et est concomitante du déclenchement de la mort cellulaire.

A



B

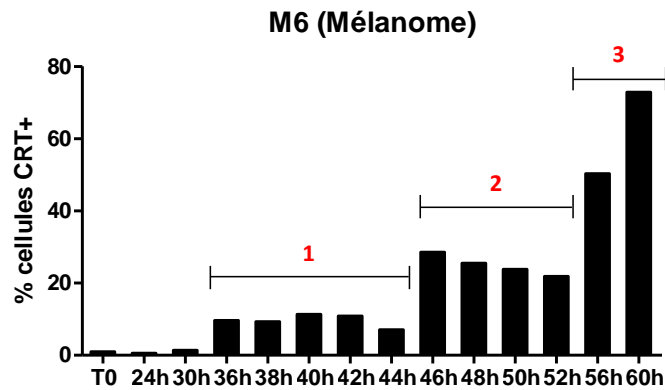


Figure 30 : *Cinétique de translocation de la calréticuline vers la surface des cellules infectées*

(A) *Les cellules non infectées et infectées (MV-eGFP, MOI=1) sont récupérées à T0 puis à 24h, 48h et 72h après infection. Elles sont ensuite marquées en extracellulaire avec un anticorps anti-calréticuline (Stressgen) puis un anticorps secondaire anti-souris couplé à la cyanine-5.*

(B) *La translocation de calréticuline vers la surface cellulaire des cellules M6 infectées par MV est suivie pendant 60 heures.*

Comme pour la protéine Hsp70, le virus MV- Δ C provoque une translocation importante de la calréticuline vers la surface cellulaire, aussi bien pour les cellules efficacement infectées par le virus MV non modifié que pour les cellules résistantes à cette infection (Figure 31). Dans les cellules Meso 13, alors que l'infection par le virus MV non modifié n'induit qu'une légère translocation de calréticuline, l'utilisation du virus MV- Δ C permet ainsi d'augmenter de façon très importante la proportion de cellules positives pour ce marquage.

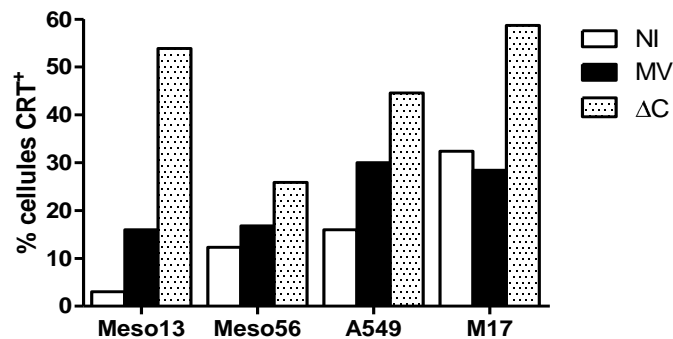


Figure 31: Translocation membranaire de la calréticuline après infection par le virus MV- Δ C

Les cellules non infectées et infectées (MV ou MV- Δ C, MOI=1) sont marquées 48h (Meso 13 et Meso 56) ou 72h (A549 et M17) après infection avec un anticorps anti-calréticuline puis un anticorps secondaire anti-souris couplé à la cyanine-5. Les cellules sont ensuite analysées par cytométrie en flux.

3. Protéine High-Mobility Group Box-1

La protéine HMGB-1 libérée dans l'environnement lors de la mort cellulaire immunogène intervient dans la maturation des DC en se liant à différents récepteurs dont les TLR4 (Apetoh *et al.*, 2007) et TLR9 (Tian *et al.*, 2007). Je me suis donc intéressé à la libération de cette protéine dans le milieu extracellulaire après l'infection de cellules tumorales par le virus MV oncolytique (Figure 32).

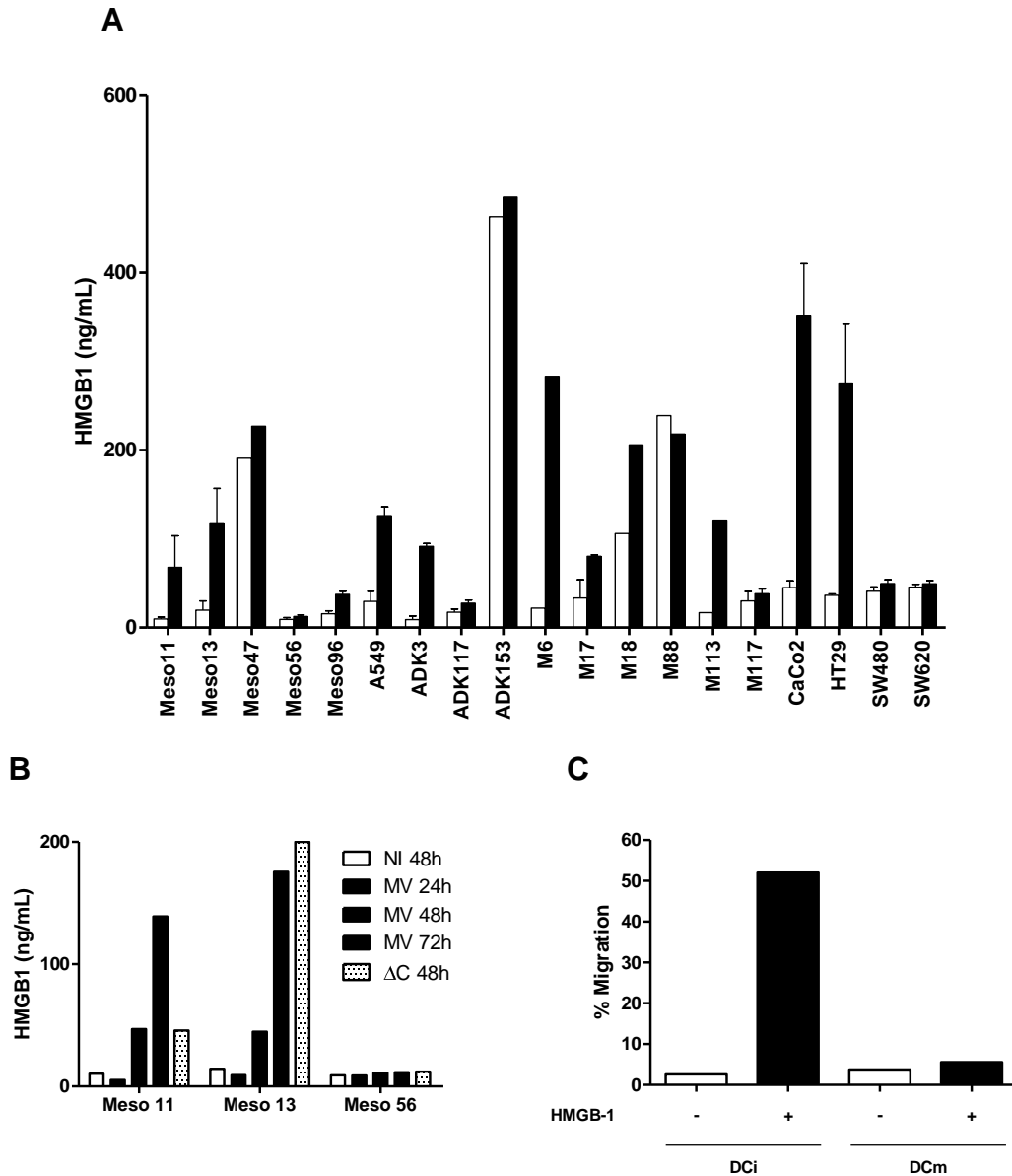


Figure 32 : Libération de HMGB-1 dans le milieu extracellulaire

(A) Les surnageants des cellules tumorales infectées (MV) ou non sont récupérés après 72 heures d'infection et stockés à -20°C. La quantité de HMGB-1 dans ces surnageants est ensuite déterminée par ELISA (Shino-test).

(B) Les cellules de mésothéliome sont infectées (MV ou MV-ΔC, MOI=1) puis les surnageants sont récupérés à 24, 48 et 72h post-infection. NI : non infecté.

(C) 100 000 DC immatures (DCi) ou maturées 18h avec un cocktail IFN-α/PolyI:C (DCm) sont placées sur des transwells de 5μm. Du HMGB-1 recombinant (HMGBiotech, 150 ng/mL) est ajouté ou non dans la chambre inférieure. Après 3h à 37°C, les cellules sont récupérées dans la chambre inférieure et comptées par cytométrie en flux.

Les lignées cellulaires efficacement infectées et lysées par le virus MV (Meso 11, Meso 13, A549, M6, M113, CaCo-2, HT29) montrent une libération importante de HMGB-1 dans le milieu extracellulaire, au contraire des cellules peu infectées telles que Meso 56, ADK117 ou M117 (Figure 32A). Cependant, l'infection par le virus MV ne provoque pas de libération de HMGB-1 par les cellules efficacement infectées Meso 96, SW480 et SW620. On sait que la libération de HMGB-1 est principalement due à la perte d'intégrité membranaire des cellules lors de l'apoptose tardive ; ces cellules ne présentent pas d'induction importante de l'apoptose suite à l'infection (voir Article ci-dessus) et conservent donc une certaine intégrité membranaire qui empêche la libération de HMGB-1.

Certaines lignées (Meso 47, ADK153, M88) présentent une libération basale de HMGB-1 dans l'environnement. La molécule HMGB-1 présente, outre ses fonctions de signal de danger, des propriétés pro-tumorales en intervenant notamment dans la prolifération des cellules malignes et la promotion de l'angiogenèse en réponse aux stress (*Schlueter et al., 2005*). HMGB-1 peut donc ainsi être sécrétée activement par les cellules tumorales en réponse aux stress afin d'améliorer leur survie.

Parallèlement, j'ai montré que le virus MV- Δ C induisait lui aussi la libération de HMGB-1 par les cellules tumorales infectées (Figure 32B). Comme montré précédemment, l'infection par MV- Δ C induit plus rapidement l'apoptose des cellules tumorales en culture ; par conséquent, ce virus induit une libération plus précoce de HMGB-1 par rapport au virus MV comme le montrent les résultats obtenus avec la lignée de mésothéliome Meso 13. J'ai ainsi pu montrer que la quantité de HMGB-1 libérée par les cellules tumorales était directement corrélée au pourcentage d'apoptose induit par l'infection virale (données non présentées).

La protéine HMGB-1 est impliquée dans la chimio-attraction et la migration des DC (*Yang et al., 2007 ; Dumitriu et al., 2007*). Afin de tester l'impact du HMGB-1 libéré par les cellules tumorales infectées, j'ai réalisé des expériences préliminaires sur la migration des DC (Figure 32C). HMGB-1 induit ainsi la migration des DC immatures (DCi) mais pas des DC matures pendant 18h en présence d'IFN- α et de PolyI:C. Ceci confirme le rôle de HMGB-1 dans la chimio-attraction des DC immatures d'une part, mais aussi l'importance de la libération de cette molécule par les cellules tumorales infectées afin de participer à l'activation de la réponse immunitaire anti-tumorale induite par la phagocytose de ces cellules tumorales infectées apoptotiques.

4. Interleukine-10

Bien que l'infection par le virus MV provoque la production et la libération de facteurs de danger permettant d'activer les cellules immunitaires, les cellules tumorales peuvent aussi sécréter des facteurs inhibiteurs de la réponse anti-tumorale. Mes résultats sur la maturation des DC décrits ci-dessus suggèrent que les surnageants des cellules tumorales contiennent des molécules immuno-inhibitrices (voir Figure 22). Les principales cytokines immuno-modulatrices pouvant être produites par les cellules tumorales sont l'interleukine-10 (IL-10) et le TGF- β (Transforming Growth Factor- β) ; j'ai donc analysé la présence d'IL-10 dans les surnageants des cellules tumorales utilisées dans notre étude (Figure 33). J'ai ainsi mis en évidence que la majorité des lignées utilisées sécrètent de l'IL-10, notamment M117, SW480 et SW620 en quantités plus importantes. Parallèlement, j'ai aussi montré que certaines de ces lignées tumorales sécrétaient du TGF- β (données non présentées).

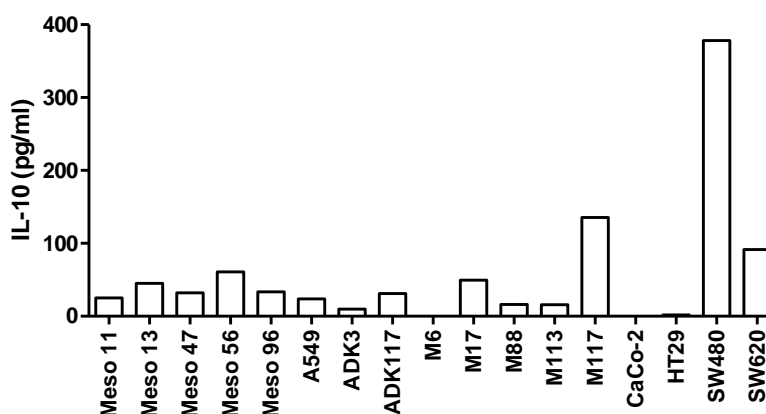


Figure 33 : *Sécrétion d'interleukine-10 par les cellules tumorales*

Les surnageants des cellules tumorales sont récupérés 72h après la mise en culture puis dosés par ELISA afin de déterminer la quantité d'IL-10 sécrétée.

5. Autres molécules immunogènes

De nombreuses autres molécules d'origine endogène présentent des propriétés immunogènes et peuvent ainsi intervenir dans l'activation des cellules de l'immunité. Hormis les protéines de la famille HSP, la calréticuline et HMGB-1, j'ai aussi testé la libération d'acide urique et d'ATP par les cellules tumorales infectées apoptotiques. Ces deux molécules

Résultats

participent à l'activation des DC en activant l'inflammasome NALP3. Cependant, mes études préliminaires n'ont pas permis de mettre en évidence de libération de ces deux types de molécules dans le milieu extracellulaire après infection par le virus MV.

DISCUSSION

Les virus oncolytiques apparaissent comme de nouvelles opportunités de traitements ciblés des cancers résistants aux traitements conventionnels. Les travaux effectués au cours des dix dernières années ont livré des résultats prometteurs qui confirment la pertinence de cette approche thérapeutique. Ainsi, de nombreuses études cliniques de phases I à III sont actuellement en cours sur différents types de virus oncolytiques. Cette diversité de virus disponibles pourrait notamment permettre d'améliorer la prise en charge clinique d'une grande variété de cancers. L'autorisation commerciale attribuée en Chine dès 2006 à l'adénovirus H101 pour le traitement de cancers ORL avancés apparaît par ailleurs comme une reconnaissance de la pertinence de cette stratégie et comme une étape importante pour le développement clinique de ce type de traitement.

Les différents travaux réalisés sur l'activité oncolytique de la souche vaccinale du virus de la rougeole (MV), notamment au sein du groupe de S.J. Russell à la Mayo Clinic (Rochester, Minnesota, Etats-Unis), ont montré sa spécificité et son efficacité contre de nombreux types de cancers (*Grote et al., 2001 ; Peng et al., 2001 ; McDonald et al., 2006 ; Msaouel et al., 2009*). Sa sécurité d'utilisation reste un avantage considérable par rapport à d'autres vecteurs viraux qui peuvent présenter certaines toxicités pour l'Homme. La première étude clinique portant sur le cancer de l'ovaire a ainsi montré des résultats cliniques prometteurs associés à une absence de toxicité à la dose maximale utilisée (*Galanis et al., 2010*).

J'ai pu montrer lors de mon travail de thèse que ce virus présentait des propriétés anti-tumorales intéressantes contre quatre nouveaux cancers : le mésothéliome, le mélanome et les adénocarcinomes pulmonaire et colorectal. Ces quatre cancers sont reconnus pour leur agressivité et leur résistance aux traitements conventionnels par chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie, notamment aux stades avancés. Alors que la plupart des travaux précédents avaient montré une activité oncolytique du virus MV *in vivo* contre des tumeurs de faible volume, nous avons choisi de travailler sur des tumeurs de volume plus important. Nous avons en effet observé des régressions spectaculaires dans le cas des mélanomes et des stabilisations à moyen terme pour les adénocarcinomes pulmonaires et colorectaux. L'ensemble des résultats obtenus apporte donc de nouveaux arguments pour une utilisation clinique du virus MV dans le cadre de la virothérapie anti-tumorale.

Un des résultats les plus intéressants de mon étude a été la mise en évidence de l'infection spécifique de cellules tumorales selon un mécanisme indépendant du récepteur

CD46. En effet, certaines lignées de mélanome présentent une infection efficace par le virus MV en dépit d'une très faible expression de cette molécule à leur surface. Tous les travaux précédents portant sur l'activité oncolytique du virus MV insistent sur l'importance de la molécule CD46 dans l'efficacité d'infection des cellules tumorales, compte-tenu de sa surexpression par de nombreuses cellules malignes. Anderson *et al.* ont ainsi décrit que la proportion de cellules infectées lors de la première « vague d'infection » était directement proportionnelle à la densité de CD46 à la surface des cellules cibles, alors que la formation des syncytia participant à la propagation de l'infection virale nécessitait elle un certain seuil d'expression de CD46 (Anderson *et al.*, 2004).

La molécule CD150/SLAM utilisée comme récepteur par la souche sauvage du virus de la rougeole est aussi impliquée dans l'infection par les souches vaccinales. Cependant, je n'ai pu mettre en évidence son expression que sur une seule des trois lignées de mélanome efficacement infectées par le virus MV. Ces résultats suggèrent donc l'implication d'un mécanisme alternatif permettant l'infection de ces cellules. Ce type d'infection, indépendant à la fois de CD150/SLAM et de CD46, a d'ailleurs déjà été décrit dans quelques travaux précédents (Takeda *et al.*, 2007). Plus généralement, il est reconnu qu'un troisième récepteur, encore non identifié et exprimé notamment sur la face baso-latérale des cellules épithéliales (Ludlow *et al.*, 2010), interviendrait dans l'infection par le virus MV (Leonard *et al.*, 2008). L'identification de ce récepteur de type « épithélial » (epithelial cell Receptor, epR) permettrait de mieux comprendre la pathologie de la rougeole et la propagation de l'infection au sein de l'organisme (Lemon *et al.*, 2011). Dans le cadre de la virothérapie anti-tumorale, la caractérisation du récepteur epR permettrait aussi de mieux maîtriser la spécificité du virus MV vis-à-vis des cellules tumorales et d'améliorer la sécurité d'un éventuel traitement chez l'Homme. Ainsi, nos collaborateurs de l'équipe du Dr Frédéric Tangy à l'Institut Pasteur ont pu identifier sur les cellules de mélanome de nouvelles molécules qui participeraient à l'infection des cellules tumorales par le virus MV. Des expériences supplémentaires devraient permettre de confirmer rapidement le rôle de ces récepteurs dans l'infection par le virus MV.

L'infection par les souches sauvage et vaccinale du virus de la rougeole provoque la formation de cellules géantes multinucléées, aussi appelées syncytia. Ce processus, qui permet notamment la propagation de l'infection en induisant la fusion des cellules infectées avec les cellules voisines, provoque *in fine* l'apoptose des cellules infectées (Esolen *et al.*, 1995). L'utilisation de virus oncolytiques présentant des propriétés pro-apoptotiques augmentées pourrait permettre de surmonter certaines résistances aux thérapies anti-tumorales

et à l'induction de la mort cellulaire (*Liu et Kim, 2005*). Le virus MV- Δ C développé par l'équipe du Dr Tangy à l'Institut Pasteur afin d'améliorer l'induction de la mort cellulaire des cellules infectées a ainsi montré des résultats intéressants. Par exemple, des cellules telles que A549 qui présentent une résistance à la mort induite par le virus MV non modifié sont au contraire efficacement lysées par le virus MV- Δ C.

L'induction potentielle d'une réponse immunitaire anti-tumorale suite à l'infection de cellules tumorales par le virus MV se heurte aux propriétés immuno-modulatrices du virus de la rougeole ainsi qu'au caractère tolérogène de la mort par apoptose. Cependant, plusieurs études ont montré que l'apoptose induite par les virus pouvait présenter un caractère immunogène en étant associée à la production de molécules de stress et à la libération de facteurs immuno-activateurs dans l'environnement (*Wang et al., 2006b ; Fábíán et al., 2007*). Il a ainsi été montré que l'infection par certains virus oncolytiques était associée à la libération de molécules telles que HMGB-1 (*Candolfi et al., 2009 ; Huang et al., 2010*). Les cellules infectées peuvent aussi sécréter des cytokines (IL-8, IFN- β) et des chimiokines (RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IP-10) pro-inflammatoires qui participent à l'activation des cellules de l'immunité, notamment des DC (*Errington et al., 2008b ; Steele et al., 2011*). De plus, le caractère adjuvant de certains virus comme le VSV est aussi impliqué dans le déclenchement de la réponse immunitaire anti-tumorale (*Kottke et al., non publié*).

L'identification récente de plusieurs molécules de danger endogènes impliquées dans l'immunogénicité de la mort cellulaire ouvre de nouvelles perspectives pour l'amélioration des stratégies d'immunothérapie anti-tumorale. Les travaux actuels visent ainsi à déterminer si certains des DAMPs identifiés sont effectivement nécessaires à l'activation du système immunitaire en réponse à la mort cellulaire induite par les thérapies anti-tumorales. Nos travaux précédents avaient déjà montré que la phagocytose de cellules de mésothéliome infectées par le virus MV oncolytique permettaient d'induire la maturation spontanée de DC (*Gauvrit et al., 2008*). Mon objectif était donc d'essayer de mieux caractériser la mort des cellules tumorales induite par le virus MV en identifiant des molécules impliquées dans cette maturation spontanée.

Je me suis intéressé à la production de différentes molécules de danger pouvant être produites ou libérées par les cellules tumorales infectées en apoptose. Ces cellules produisent en effet plusieurs facteurs de danger impliqués à différents niveaux dans l'activation des DC humaines. L'infection des cellules tumorales par le virus MV induit notamment la translocation de calréticuline vers la surface cellulaire, l'expression de Hsp70 et la libération

passive de HMGB-1 dans le milieu extracellulaire. La calréticuline est impliquée dans la phagocytose des cellules apoptotiques par les DC (Ogden *et al.*, 2001) et joue de cette façon un rôle prépondérant dans l'internalisation des antigènes tumoraux. La capacité de la protéine de stress Hsp70 de lier des peptides antigéniques (Nieland *et al.*, 1996) et d'être reconnue par les cellules phagocytaires (Oglesbee *et al.*, 2002) revêt elle un intérêt considérable pour une présentation efficace des antigènes tumoraux sur les molécules du CMH I par les CPA. Enfin, outre ses propriétés de chimiotactisme (Yang *et al.*, 2007), HMGB-1 peut aussi être reconnue par différents récepteurs de danger exprimés à la surface des cellules de l'immunité (Messmer *et al.*, 2004) et jouerait ainsi un rôle important dans l'activation de ces cellules en réponse à la mort cellulaire.

Il sera à présent nécessaire de déterminer si certains de ces facteurs de danger peuvent effectivement dicter l'immunogénicité de la mort cellulaire comme le suggèrent certains travaux récents (Obeid *et al.*, 2007a). Mes expériences préliminaires ont ainsi montré que la fraction cellulaires des cellules tumorales infectées par MV était plus efficace que le surnageant pour induire la maturation des DC et qu'un contact direct entre la DC et les corps apoptotiques était nécessaire à cette activation. Cependant, il restera aussi à définir quelles sont les facteurs jouant un rôle important dans la promotion de la présentation d'antigènes et de l'activation d'une réponse lymphocytaire T spécifique.

Le virus MV- Δ C pourrait permettre de répondre à certaines de ces hypothèses. En effet, même si ce virus est effectivement capable d'induire la mort cellulaire de façon plus efficace que le virus MV non modifié, la question se posait quant à sa capacité à augmenter l'immunogénicité des cellules tumorales. Mes résultats préliminaires montrent que le virus MV- Δ C permet effectivement la production ou la libération de signaux de danger. L'induction efficace de l'apoptose est en effet corrélée à une forte libération de HMGB-1 dans le milieu extracellulaire. De façon plus surprenante, l'infection par le virus MV- Δ C induit aussi une translocation plus importante de la calréticuline et de la protéine Hsp70 à la surface des cellules que l'infection par le virus MV non modifié.

Outre l'analyse de la maturation phénotypique des DC, l'étude de l'activation de la réponse T spécifique est primordiale pour identifier l'induction d'une réponse anti-tumorale efficace. Nos résultats précédents avaient montré que les DC ayant phagocytés des cellules de mésothéliome infectées pouvaient induire la prolifération de lymphocytes T CD8 spécifiques de l'antigène mésothéline (Gauvrit *et al.*, 2008). Afin de confirmer ces résultats, je me suis intéressé à un deuxième antigène exprimé par les cellules de mésothéliome, MUC-1. En

utilisant un clone T CD8 spécifique de cet antigène obtenu au sein du laboratoire, nous avons pu effectivement montrer que les DC co-cultivées avec des cellules tumorales infectées étaient plus efficaces pour activer ce clone CD8 que les DC immatures. Ces résultats sont un argument supplémentaire attestant de façon indirecte de la présentation croisée des antigènes MUC-1 issus des cellules tumorales. La confirmation de la présentation croisée des antigènes issus des cellules tumorales infectées sera essentielle dans le développement d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace agissant en synergie avec l'activité oncolytique directe du virus MV.

D'un point de vue clinique se pose la question de la pertinence des traitements anti-tumoraux basés sur l'utilisation du virus oncolytique MV. En effet, ces nouvelles stratégies devront d'abord démontrer leur efficacité et leur innocuité chez l'Homme avant de pouvoir être envisagées comme des alternatives aux traitements conventionnels. Le premier essai clinique sur le virus MV mené à la Mayo Clinic chez des patientes atteintes de carcinomes ovariens avancés permet de répondre en partie à ces questions ; en effet, le traitement n'a pas révélé de toxicité, même à la dose maximale utilisée, et des réponses cliniques ont pu être observées.

Les données disponibles plaident davantage pour une utilisation de la virothérapie dans le traitement de cancers localisés. En effet, de nombreuses études ont précédemment montré que l'immunité antivirale (anticorps, complément, cellules phagocytaires, ...) pouvait totalement inhiber l'activité anti-tumorale des virus oncolytique en cas d'injection systémique (*Ikedo et al., 1999*). Le développement de nouvelles stratégies d'injection, comme l'utilisation de « cell carriers » par exemple, pourrait cependant permettre de surmonter ces différents obstacles. Les principales pathologies ciblées par la virothérapie anti-tumorale pourraient en fait être les cancers se développant dans des cavités telles que la vessie, la cavité péritonéale ou la cavité pleurale, voire des cancers accessibles pour une injection à proximité immédiate du site de la tumeur. Le mésothéliome pleural malin apparaît ainsi comme une cible intéressante, du fait du confinement des cellules tumorales dans la cavité pleurale et de son accessibilité pour une injection des virus.

Plusieurs travaux récents ont par ailleurs montré que l'activité oncolytique de certains virus était augmentée lorsqu'ils étaient utilisés en combinaison avec d'autres types de traitements anti-tumoraux par radiothérapie ou chimiothérapie (*Nguyen et al., 2009*). Le traitement par des inhibiteurs des histone déacétylases (iHDAC) permet ainsi d'améliorer

l'activité oncolytique de certains virus (*Otsuki et al., 2008*). Notre équipe travaille à la fois sur l'utilisation des iHDAC et sur l'infection par le virus MV afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques contre les tumeurs résistantes. La combinaison de ces deux approches pourrait nous permettre d'améliorer leurs effets cytotoxiques respectifs et d'augmenter l'activation de la réponse immunitaire.

Afin d'améliorer l'implication du système immunitaire dans le cadre de la virothérapie anti-tumorale, d'autres approches peuvent être envisagées. Nous savons que le micro-environnement tumoral contient des facteurs immuno-modulateurs impliqués dans l'inhibition de la réponse anti-tumorale. J'ai ainsi mis en évidence que les cellules testées étaient capables de sécréter des cytokines immuno-inhibitrices telles que l'IL-10 et le TGF- β . Comme l'ont déjà montré certaines études (*Takaku et al., 2009 ; Terabe et al., 2009 ; Bellavance et al., 2011*), le blocage de ce type de facteurs permet d'améliorer l'efficacité des protocoles d'immunothérapie et pourrait par conséquent aussi permettre d'augmenter l'activité anti-tumorale des virus oncolytiques.

L'ensemble des études menées sur les virus oncolytiques apporte de nombreux arguments pour leur utilisation à moyen terme dans un cadre clinique. Les propriétés particulières de la souche vaccinale Schwarz du virus de la rougeole en font un des agents les plus prometteurs dans cette optique. En effet, outre sa sécurité d'utilisation, le virus MV présente la capacité de cibler une grande diversité de cancers, d'induire la mort des cellules infectées de façon efficace, mais aussi d'activer une réponse anti-tumorale spécifique pouvant agir en synergie avec l'activité oncolytique directe afin d'améliorer l'effet anti-tumoral.

Mes résultats apportent de nouveaux éléments, aussi bien sur l'activité oncolytique du virus MV envers les cancers agressifs que sur sa capacité à activer les cellules dendritiques afin de favoriser le développement d'une réponse lymphocytaire T efficace. La compréhension des mécanismes menant à l'immunogénicité de la mort cellulaire induite par ce virus pourrait permettre d'améliorer l'induction de cette réponse anti-tumorale et d'envisager de meilleures réponses cliniques.

BIBLIOGRAPHIE

- Ackerman, A. L., Giodini, A. et Cresswell, P. (2006) "A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells." *Immunity* **25**(4): 607-617.
- Ahtiainen, L., Mirantes, C., Jahkola, T., Escutenaire, S., Diaconu, I., Osterlund, P., Kanerva, A., Cerullo, V. et Hemminki, A. (2010) "Defects in innate immunity render breast cancer initiating cells permissive to oncolytic adenovirus." *PLoS One* **5**(11): e13859.
- Alain, T., Hirasawa, K., Pon, K. J., Nishikawa, S. G., Urbanski, S. J., Auer, Y., Luidner, J., Martin, A., Johnston, R. N., Janowska-Wieczorek, A., Lee, P. W. et Kossakowska, A. E. (2002) "Reovirus therapy of lymphoid malignancies." *Blood* **100**(12): 4146-4153.
- Albert, M. L., Sauter, B. et Bhardwaj, N. (1998) "Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs." *Nature* **392**(6671): 86-89.
- Alleva, L. M., Budd, A. C. et Clark, I. A. (2008) "Systemic release of high mobility group box 1 protein during severe murine influenza." *J Immunol* **181**(2): 1454-1459.
- Amanna, I. J., Slifka, M. K. et Crotty, S. (2006) "Immunity and immunological memory following smallpox vaccination." *Immunol Rev* **211**(320-337).
- Amigorena, S. et Savina, A. (2010) "Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells." *Curr Opin Immunol* **22**(1): 109-117.
- Anderson, B. D., Nakamura, T., Russell, S. J. et Peng, K. W. (2004) "High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus." *Cancer Res* **64**(14): 4919-4926.
- Andersson, U., Wang, H., Palmblad, K., Aveberger, A. C., Bloom, O., Erlandsson-Harris, H., Janson, A., Kokkola, R., Zhang, M., Yang, H. et Tracey, K. J. (2000) "High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes." *J Exp Med* **192**(4): 565-570.
- Angelova, A. L., Aprahamian, M., Balboni, G., Delecluse, H. J., Feederle, R., Kiprianova, I., Grekova, S. P., Galabov, A. S., Witzens-Harig, M., Ho, A. D., Rommelaere, J. et Raykov, Z. (2009) "Oncolytic rat parvovirus H-1PV, a candidate for the treatment of human lymphoma: In vitro and in vivo studies." *Mol Ther* **17**(7): 1164-1172.
- Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A., Mignot, G., Maiuri, M. C., Ullrich, E., Saulnier, P., Yang, H., Amigorena, S., Ryffel, B., Barrat, F. J., Saftig, P., Levi, F., Lidereau, R., Noguez, C., Mira, J. P., Chompret, A., Joulin, V., Clavel-Chapelon, F., Bourhis, J., Andre, F., Delaloge, S., Tursz, T., Kroemer, G. et Zitvogel, L. (2007) "Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy." *Nat Med* **13**(9): 1050-1059.
- Apetoh, L., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Kroemer, G. et Zitvogel, L. (2008) "Molecular interactions between dying tumor cells and the innate immune system determine the efficacy of conventional anticancer therapies." *Cancer Res* **68**(11): 4026-4030.
- Asea, A., Kraeft, S. K., Kurt-Jones, E. A., Stevenson, M. A., Chen, L. B., Finberg, R. W., Koo, G. C. et Calderwood, S. K. (2000) "HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine." *Nat Med* **6**(4): 435-442.
- Bacik, I., Snyder, H. L., Anton, L. C., Russ, G., Chen, W., Bennink, J. R., Urge, L., Otvos, L., Dudkowska, B., Eisenlohr, L. et Yewdell, J. W. (1997) "Introduction of a glycosylation site into a secreted protein provides evidence for an alternative antigen

- processing pathway: transport of precursors of major histocompatibility complex class I-restricted peptides from the endoplasmic reticulum to the cytosol." J Exp Med **186**(4): 479-487.
- Baksh, S. et Michalak, M. (1991) "Expression of calreticulin in Escherichia coli and identification of its Ca²⁺ binding domains." J Biol Chem **266**(32): 21458-21465.
- Balachandran, S., Porosnicu, M. et Barber, G. N. (2001) "Oncolytic activity of vesicular stomatitis virus is effective against tumors exhibiting aberrant p53, Ras, or myc function and involves the induction of apoptosis." J Virol **75**(7): 3474-3479.
- Barber, G. N. (2001) "Host defense, viruses and apoptosis." Cell Death Differ **8**(2): 113-126.
- Barber, G. N. (2004) "Vesicular stomatitis virus as an oncolytic vector." Viral Immunol **17**(4): 516-527.
- Barlan, A. U., Griffin, T. M., McGuire, K. A. et Wiethoff, C. M. (2011) "Adenovirus membrane penetration activates the NLRP3 inflammasome." J Virol **85**(1): 146-155.
- Barqasho, B., Nowak, P., Abdurahman, S., Walther-Jallow, L. et Sonnerborg, A. (2010) "Implications of the release of high-mobility group box 1 protein from dying cells during human immunodeficiency virus type 1 infection in vitro." J Gen Virol **91**(Pt 7): 1800-1809.
- Barral, D. C. et Brenner, M. B. (2007) "CD1 antigen presentation: how it works." Nat Rev Immunol **7**(12): 929-941.
- Basu, S., Binder, R. J., Ramalingam, T. et Srivastava, P. K. (2001) "CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin." Immunity **14**(3): 303-313.
- Basu, S., Binder, R. J., Suto, R., Anderson, K. M. et Srivastava, P. K. (2000) "Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway." Int Immunol **12**(11): 1539-1546.
- Bateman, A., Bullough, F., Murphy, S., Emiliusén, L., Lavillette, D., Cosset, F. L., Cattaneo, R., Russell, S. J. et Vile, R. G. (2000) "Fusogenic membrane glycoproteins as a novel class of genes for the local and immune-mediated control of tumor growth." Cancer Res **60**(6): 1492-1497.
- Becker, T., Hartl, F. U. et Wieland, F. (2002) "CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes." J Cell Biol **158**(7): 1277-1285.
- Bell, C. W., Jiang, W., Reich, C. F., 3rd et Pisetsky, D. S. (2006) "The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death." Am J Physiol Cell Physiol **291**(6): C1318-1325.
- Bellavance, E. C., Kohlhapp, F. J., Zloza, A., O'Sullivan, J. A., McCracken, J., Jagoda, M. C., Lacey, A. T., Posner, M. C. et Guevara-Patino, J. A. (2011) "Development of Tumor-Infiltrating CD8⁺ T Cell Memory Precursor Effector Cells and Antimelanoma Memory Responses Are the Result of Vaccination and TGF- β Blockade during the Perioperative Period of Tumor Resection." J Immunol **186**(6): 3309-3316.
- Bellini, W. J., Rota, J. S. et Rota, P. A. (1994) "Virology of measles virus." J Infect Dis **170** Suppl 1(S15-23).
- Bendz, H., Marincek, B. C., Momburg, F., Ellwart, J. W., Issels, R. D., Nelson, P. J. et

- Noessner, E. (2008) "Calcium signaling in dendritic cells by human or mycobacterial Hsp70 is caused by contamination and is not required for Hsp70-mediated enhancement of cross-presentation." *J Biol Chem* **283**(39): 26477-26483.
- Benlalam, H., Vignard, V., Khammari, A., Bonnin, A., Godet, Y., Pandolfino, M. C., Jotereau, F., Dreno, B. et Labarriere, N. (2007) "Infusion of Melan-A/Mart-1 specific tumor-infiltrating lymphocytes enhanced relapse-free survival of melanoma patients." *Cancer Immunol Immunother* **56**(4): 515-526.
- Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Flavell, R. A., Miller, J. F. et Heath, W. R. (1998) "Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling." *Nature* **393**(6684): 478-480.
- Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Miller, J. F. et Heath, W. R. (1997) "Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help." *J Exp Med* **186**(1): 65-70.
- Bensch, K. G. et Malawista, S. E. (1968) "Microtubule crystals: a new biophysical phenomenon induced by Vinca alkaloids." *Nature* **218**(5147): 1176-1177.
- Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., Crowell, R. L. et Finberg, R. W. (1997) "Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5." *Science* **275**(5304): 1320-1323.
- Bergmann, M., Romirer, I., Sachet, M., Fleischhacker, R., Garcia-Sastre, A., Palese, P., Wolff, K., Pehamberger, H., Jakesz, R. et Muster, T. (2001) "A genetically engineered influenza A virus with ras-dependent oncolytic properties." *Cancer Res* **61**(22): 8188-8193.
- Bergsbaken, T., Fink, S. L. et Cookson, B. T. (2009) "Pyroptosis: host cell death and inflammation." *Nat Rev Microbiol* **7**(2): 99-109.
- Bertini, R., Howard, O. M., Dong, H. F., Oppenheim, J. J., Bizzarri, C., Sergi, R., Caselli, G., Pagliei, S., Romines, B., Wilshire, J. A., Mengozzi, M., Nakamura, H., Yodoi, J., Pekkari, K., Gurunath, R., Holmgren, A., Herzenberg, L. A. et Ghezzi, P. (1999) "Thioredoxin, a redox enzyme released in infection and inflammation, is a unique chemoattractant for neutrophils, monocytes, and T cells." *J Exp Med* **189**(11): 1783-1789.
- Berwin, B., Hart, J. P., Rice, S., Gass, C., Pizzo, S. V., Post, S. R. et Nicchitta, C. V. (2003) "Scavenger receptor-A mediates gp96/GRP94 and calreticulin internalization by antigen-presenting cells." *EMBO J* **22**(22): 6127-6136.
- Bessis, N., GarciaCozar, F. J. et Boissier, M. C. (2004) "Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms." *Gene Ther* **11 Suppl 1**(S10-17).
- Binder, R. J., Han, D. K. et Srivastava, P. K. (2000) "CD91: a receptor for heat shock protein gp96." *Nat Immunol* **1**(2): 151-155.
- Binder, R. J. et Srivastava, P. K. (2005) "Peptides chaperoned by heat-shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of CD8+ T cells." *Nat Immunol* **6**(6): 593-599.
- Bischoff, J. R., Kirn, D. H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J. A., Sampson-Johannes, A., Fattaey, A. et McCormick, F. (1996) "An adenovirus mutant

- that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells." Science **274**(5286): 373-376.
- Bjorge, L., Hakulinen, J., Wahlstrom, T., Matre, R. et Meri, S. (1997) "Complement-regulatory proteins in ovarian malignancies." Int J Cancer **70**(1): 14-25.
- Blachere, N. E., Li, Z., Chandawarkar, R. Y., Suto, R., Jaikaria, N. S., Basu, S., Udono, H. et Srivastava, P. K. (1997) "Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity." J Exp Med **186**(8): 1315-1322.
- Bohm, I. et Schild, H. (2003) "Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death." Mol Imaging Biol **5**(1): 2-14.
- Boisgerault, N., Tangy, F. et Gregoire, M. (2010) "New perspectives in cancer virotherapy: bringing the immune system into play." Immunotherapy **2**(2): 185-199.
- Boisteau, O., Gautier, F., Cordel, S., Henry, F., Harb, J., Douillard, J. Y., Vallette, F. M., Meflah, K. et Gregoire, M. (1997) "Apoptosis induced by sodium butyrate treatment increases immunogenicity of a rat colon tumor cell line." Apoptosis **2**(4): 403-412.
- Bonaldi, T., Talamo, F., Scaffidi, P., Ferrera, D., Porto, A., Bachi, A., Rubartelli, A., Agresti, A. et Bianchi, M. E. (2003) "Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion." EMBO J **22**(20): 5551-5560.
- Bours, M. J., Swennen, E. L., Di Virgilio, F., Cronstein, B. N. et Dagnelie, P. C. (2006) "Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation." Pharmacol Ther **112**(2): 358-404.
- Brett, J., Schmidt, A. M., Yan, S. D., Zou, Y. S., Weidman, E., Pinsky, D., Nowygrod, R., Neeper, M., Przysiecki, C., Shaw, A. et al. (1993) "Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues." Am J Pathol **143**(6): 1699-1712.
- Brin, E., Atencio, I., Helmich, B. K., Maneval, D. et Laface, D. (2006) "Adenovirus delivery provides extended interferon-alpha exposure and augments treatment of metastatic carcinoma." Cancer Gene Ther **13**(7): 664-675.
- Bulut, Y., Faure, E., Thomas, L., Karahashi, H., Michelsen, K. S., Equils, O., Morrison, S. G., Morrison, R. P. et Ardit, M. (2002) "Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway." J Immunol **168**(3): 1435-1440.
- Burdak-Rothkamm, S. et Prise, K. M. (2009) "New molecular targets in radiotherapy: DNA damage signalling and repair in targeted and non-targeted cells." Eur J Pharmacol **625**(1-3): 151-155.
- Bursch, W. (2001) "The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death." Cell Death Differ **8**(6): 569-581.
- Calderwood, S. K., Mambula, S. S., Gray, P. J., Jr. et Theriault, J. R. (2007) "Extracellular heat shock proteins in cell signaling." FEBS Lett **581**(19): 3689-3694.
- Candolfi, M., Yagiz, K., Foulad, D., Alzadeh, G. E., Tesarfreund, M., Muhammad, A. K., Puntel, M., Kroeger, K. M., Liu, C., Lee, S., Curtin, J. F., King, G. D., Lerner, J., Sato, K., Mineharu, Y., Xiong, W., Lowenstein, P. R. et Castro, M. G. (2009) "Release of HMGB1 in response to proapoptotic glioma killing strategies: efficacy and neurotoxicity." Clin Cancer Res **15**(13): 4401-4414.

- Cattaneo, R. (2004) "Four viruses, two bacteria, and one receptor: membrane cofactor protein (CD46) as pathogens' magnet." *J Virol* **78**(9): 4385-4388.
- Chiocca, E. A. (2002) "Oncolytic viruses." *Nat Rev Cancer* **2**(12): 938-950.
- Chipuk, J. E. et Green, D. R. (2008) "How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization?" *Trends Cell Biol* **18**(4): 157-164.
- Cole, C., Qiao, J., Kottke, T., Diaz, R. M., Ahmed, A., Sanchez-Perez, L., Brunn, G., Thompson, J., Chester, J. et Vile, R. G. (2005) "Tumor-targeted, systemic delivery of therapeutic viral vectors using hitchhiking on antigen-specific T cells." *Nat Med* **11**(10): 1073-1081.
- Combredet, C., Labrousse, V., Mollet, L., Lorin, C., Delebecque, F., Hurtrel, B., McClure, H., Feinberg, M. B., Brahic, M. et Tangy, F. (2003) "A molecularly cloned Schwarz strain of measles virus vaccine induces strong immune responses in macaques and transgenic mice." *J Virol* **77**(21): 11546-11554.
- Coppolino, M. G., Woodside, M. J., Demaux, N., Grinstein, S., St-Arnaud, R. et Dedhar, S. (1997) "Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion." *Nature* **386**(6627): 843-847.
- Cotter, T. G. (2009) "Apoptosis and cancer: the genesis of a research field." *Nat Rev Cancer* **9**(7): 501-507.
- Coughlan, L., Vallath, S., Saha, A., Flak, M., McNeish, I. A., Vassaux, G., Marshall, J. F., Hart, I. R. et Thomas, G. J. (2009) "In vivo retargeting of adenovirus type 5 to alphavbeta6 integrin results in reduced hepatotoxicity and improved tumor uptake following systemic delivery." *J Virol* **83**(13): 6416-6428.
- Crane, J. K., Olson, R. A., Jones, H. M. et Duffey, M. E. (2002) "Release of ATP during host cell killing by enteropathogenic E. coli and its role as a secretory mediator." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **283**(1): G74-86.
- Curtin, J. F., Liu, N., Candolfi, M., Xiong, W., Assi, H., Yagiz, K., Edwards, M. R., Michelsen, K. S., Kroeger, K. M., Liu, C., Muhammad, A. K., Clark, M. C., Arditi, M., Comin-Anduix, B., Ribas, A., Lowenstein, P. R. et Castro, M. G. (2009) "HMGB1 mediates endogenous TLR2 activation and brain tumor regression." *PLoS Med* **6**(1): e10.
- Curtsinger, J. M., Lins, D. C. et Mescher, M. F. (2003) "Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function." *J Exp Med* **197**(9): 1141-1151.
- Curtsinger, J. M., Schmidt, C. S., Mondino, A., Lins, D. C., Kedl, R. M., Jenkins, M. K. et Mescher, M. F. (1999) "Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells." *J Immunol* **162**(6): 3256-3262.
- Curtsinger, J. M., Valenzuela, J. O., Agarwal, P., Lins, D. et Mescher, M. F. (2005) "Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation." *J Immunol* **174**(8): 4465-4469.
- Dai, M. H., Zamarin, D., Gao, S. P., Chou, T. C., Gonzalez, L., Lin, S. F. et Fong, Y. (2010) "Synergistic action of oncolytic herpes simplex virus and radiotherapy in pancreatic cancer cell lines." *Br J Surg* **97**(9): 1385-1394.
- Datta, S. K., Redecke, V., Prilliman, K. R., Takabayashi, K., Corr, M., Tallant, T., DiDonato, J., Dziarski, R., Akira, S., Schoenberger, S. P. et Raz, E. (2003) "A subset of Toll-

- like receptor ligands induces cross-presentation by bone marrow-derived dendritic cells." *J Immunol* **170**(8): 4102-4110.
- de Brito, C., Tomkowiak, M., Ghittoni, R., Caux, C., Leverrier, Y. et Marvel, J. (2011) "CpG promotes cross-presentation of dead cell-associated antigens by pre-CD8alpha+ dendritic cells." *J Immunol* **186**(3): 1503-1511.
- Dehecchi, M. C., Melotti, P., Bonizzato, A., Santacatterina, M., Chilosi, M. et Cabrini, G. (2001) "Heparan sulfate glycosaminoglycans are receptors sufficient to mediate the initial binding of adenovirus types 2 and 5." *J Virol* **75**(18): 8772-8780.
- Degryse, B., Bonaldi, T., Scaffidi, P., Muller, S., Resnati, M., Sanvito, F., Arrighi, G. et Bianchi, M. E. (2001) "The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMGB1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells." *J Cell Biol* **152**(6): 1197-1206.
- Degterev, A. et Yuan, J. (2008) "Expansion and evolution of cell death programmes." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(5): 378-390.
- Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I. et Trombetta, E. S. (2005) "Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate." *Science* **307**(5715): 1630-1634.
- Delneste, Y., Magistrelli, G., Gauchat, J., Haeuw, J., Aubry, J., Nakamura, K., Kawakami-Honda, N., Goetsch, L., Sawamura, T., Bonnefoy, J. et Jeannin, P. (2002) "Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation." *Immunity* **17**(3): 353-362.
- Devitt, A., Moffatt, O. D., Raykundalia, C., Capra, J. D., Simmons, D. L. et Gregory, C. D. (1998) "Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells." *Nature* **392**(6675): 505-509.
- Dhiman, N., Jacobson, R. M. et Poland, G. A. (2004) "Measles virus receptors: SLAM and CD46." *Rev Med Virol* **14**(4): 217-229.
- Di Piazza, M., Mader, C., Geletneky, K., Herrero, Y. C. M., Weber, E., Schlehofer, J., Deleu, L. et Rommelaere, J. (2007) "Cytosolic activation of cathepsins mediates parvovirus H-1-induced killing of cisplatin and TRAIL-resistant glioma cells." *J Virol* **81**(8): 4186-4198.
- Di Virgilio, F. (2007) "Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome." *Trends Pharmacol Sci* **28**(9): 465-472.
- Dobrikova, E. Y., Broadt, T., Poiley-Nelson, J., Yang, X., Soman, G., Giardina, S., Harris, R. et Gromeier, M. (2008) "Recombinant oncolytic poliovirus eliminates glioma in vivo without genetic adaptation to a pathogenic phenotype." *Mol Ther* **16**(11): 1865-1872.
- Dohring, C. et Colonna, M. (1996) "Human natural killer cell inhibitory receptors bind to HLA class I molecules." *Eur J Immunol* **26**(2): 365-369.
- Dumitriu, I. E., Baruah, P., Bianchi, M. E., Manfredi, A. A. et Rovere-Querini, P. (2005) "Requirement of HMGB1 and RAGE for the maturation of human plasmacytoid dendritic cells." *Eur J Immunol* **35**(7): 2184-2190.
- Dumitriu, I. E., Bianchi, M. E., Bacci, M., Manfredi, A. A. et Rovere-Querini, P. (2007) "The secretion of HMGB1 is required for the migration of maturing dendritic cells." *J Leukoc Biol* **81**(1): 84-91.
- Duprez, L., Wirawan, E., Vanden Berghe, T. et Vandenabeele, P. (2009) "Major cell death

- pathways at a glance." *Microbes Infect* **11**(13): 1050-1062.
- Efferson, C. L., Tsuda, N., Kawano, K., Nistal-Villan, E., Sellappan, S., Yu, D., Murray, J. L., Garcia-Sastre, A. et Ioannides, C. G. (2006) "Prostate tumor cells infected with a recombinant influenza virus expressing a truncated NS1 protein activate cytolytic CD8+ cells to recognize noninfected tumor cells." *J Virol* **80**(1): 383-394.
- Elankumaran, S., Rockemann, D. et Samal, S. K. (2006) "Newcastle disease virus exerts oncolysis by both intrinsic and extrinsic caspase-dependent pathways of cell death." *J Virol* **80**(15): 7522-7534.
- Enders, J. F. et Peebles, T. C. (1954) "Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles." *Proc Soc Exp Biol Med* **86**(2): 277-286.
- Erlenhofer, C., Duprex, W. P., Rima, B. K., ter Meulen, V. et Schneider-Schaulies, J. (2002) "Analysis of receptor (CD46, CD150) usage by measles virus." *J Gen Virol* **83**(Pt 6): 1431-1436.
- Errington, F., Steele, L., Prestwich, R., Harrington, K. J., Pandha, H. S., Vidal, L., de Bono, J., Selby, P., Coffey, M., Vile, R. et Melcher, A. (2008) "Reovirus activates human dendritic cells to promote innate antitumor immunity." *J Immunol* **180**(9): 6018-6026.
- Errington, F., White, C. L., Twigger, K. R., Rose, A., Scott, K., Steele, L., Ilett, L. J., Prestwich, R., Pandha, H. S., Coffey, M., Selby, P., Vile, R., Harrington, K. J. et Melcher, A. A. (2008) "Inflammatory tumour cell killing by oncolytic reovirus for the treatment of melanoma." *Gene Ther* **15**(18): 1257-1270.
- Esolen, L. M., Park, S. W., Hardwick, J. M. et Griffin, D. E. (1995) "Apoptosis as a cause of death in measles virus-infected cells." *J Virol* **69**(6): 3955-3958.
- Fernandez, N. C., Lozier, A., Flament, C., Ricciardi-Castagnoli, P., Bellet, D., Suter, M., Perricaudet, M., Tursz, T., Maraskovsky, E. et Zitvogel, L. (1999) "Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo." *Nat Med* **5**(4): 405-411.
- Festjens, N., Vanden Berghe, T. et Vandenabeele, P. (2006) "Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response." *Biochim Biophys Acta* **1757**(9-10): 1371-1387.
- Fink, A. L. (1999) "Chaperone-mediated protein folding." *Physiol Rev* **79**(2): 425-449.
- Fink, S. L. et Cookson, B. T. (2006) "Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages." *Cell Microbiol* **8**(11): 1812-1825.
- Fishelson, Z., Donin, N., Zell, S., Schultz, S. et Kirschfink, M. (2003) "Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors." *Mol Immunol* **40**(2-4): 109-123.
- Floto, R. A., MacAry, P. A., Boname, J. M., Mien, T. S., Kampmann, B., Hair, J. R., Huey, O. S., Houben, E. N., Pieters, J., Day, C., Oehlmann, W., Singh, M., Smith, K. G. et Lehner, P. J. (2006) "Dendritic cell stimulation by mycobacterial Hsp70 is mediated through CCR5." *Science* **314**(5798): 454-458.
- Fooksman, D. R., Vardhana, S., Vasiliver-Shamis, G., Liese, J., Blair, D. A., Waite, J., Sacristan, C., Victora, G. D., Zanin-Zhorov, A. et Dustin, M. L. (2010) "Functional anatomy of T cell activation and synapse formation." *Annu Rev Immunol* **28**(79-105).
- Frantz, S., Ducharme, A., Sawyer, D., Rohde, L. E., Kobzik, L., Fukazawa, R., Tracey, D.,

- Allen, H., Lee, R. T. et Kelly, R. A. (2003) "Targeted deletion of caspase-1 reduces early mortality and left ventricular dilatation following myocardial infarction." J Mol Cell Cardiol **35**(6): 685-694.
- Freeman, A. I., Zakay-Rones, Z., Gomori, J. M., Linetsky, E., Rasooly, L., Greenbaum, E., Rozenman-Yair, S., Panet, A., Libson, E., Irving, C. S., Galun, E. et Siegal, T. (2006) "Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme." Mol Ther **13**(1): 221-228.
- Fujimoto, Y., Mizuno, T., Sugiura, S., Goshima, F., Kohno, S., Nakashima, T. et Nishiyama, Y. (2006) "Intratumoral injection of herpes simplex virus HF10 in recurrent head and neck squamous cell carcinoma." Acta Otolaryngol **126**(10): 1115-1117.
- Fulci, G., Breymann, L., Gianni, D., Kurozumi, K., Rhee, S. S., Yu, J., Kaur, B., Louis, D. N., Weissleder, R., Caligiuri, M. A. et Chiocca, E. A. (2006) "Cyclophosphamide enhances glioma virotherapy by inhibiting innate immune responses." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(34): 12873-12878.
- Galanis, E., Hartmann, L. C., Cliby, W. A., Long, H. J., Peethambaram, P. P., Barrette, B. A., Kaur, J. S., Haluska, P. J., Jr., Aderca, I., Zollman, P. J., Sloan, J. A., Keeney, G., Atherton, P. J., Podratz, K. C., Dowdy, S. C., Stanhope, C. R., Wilson, T. O., Federspiel, M. J., Peng, K. W. et Russell, S. J. (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**(3): 875-882.
- Gancz, D. et Fishelson, Z. (2009) "Cancer resistance to complement-dependent cytotoxicity (CDC): Problem-oriented research and development." Mol Immunol **46**(14): 2794-2800.
- Garbe, C., Eigentler, T. K., Keilholz, U., Hauschild, A. et Kirkwood, J. M. (2011) "Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects." Oncologist **16**(1): 5-24.
- Garber, K. (2006) "China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment." J Natl Cancer Inst **98**(5): 298-300.
- Gardai, S. J., Bratton, D. L., Ogden, C. A. et Henson, P. M. (2006) "Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective." J Leukoc Biol **79**(5): 896-903.
- Gardai, S. J., McPhillips, K. A., Frasch, S. C., Janssen, W. J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J. E., Bratton, D. L., Oldenborg, P. A., Michalak, M. et Henson, P. M. (2005) "Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte." Cell **123**(2): 321-334.
- Gardella, S., Andrei, C., Ferrera, D., Lotti, L. V., Torrissi, M. R., Bianchi, M. E. et Rubartelli, A. (2002) "The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway." EMBO Rep **3**(10): 995-1001.
- Gauvrit, A., Brandler, S., Sapede-Peroz, C., Boisgerault, N., Tangy, F. et Gregoire, M. (2008) "Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response." Cancer Res **68**(12): 4882-4892.
- Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G. et Trinchieri, G. (2002) "Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells." J Exp Med **195**(3): 327-333.
- Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C., Vermaelen, K.,

- Panaretakis, T., Mignot, G., Ullrich, E., Perfettini, J. L., Schlemmer, F., Tasdemir, E., Uhl, M., Genin, P., Civas, A., Ryffel, B., Kanellopoulos, J., Tschopp, J., Andre, F., Lidereau, R., McLaughlin, N. M., Haynes, N. M., Smyth, M. J., Kroemer, G. et Zitvogel, L. (2009) "Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors." *Nat Med* **15**(10): 1170-1178.
- Gollamudi, R., Ghalib, M. H., Desai, K. K., Chaudhary, I., Wong, B., Einstein, M., Coffey, M., Gill, G. M., Mettinger, K., Mariadason, J. M., Mani, S. et Goel, S. (2010) "Intravenous administration of Reolysin, a live replication competent RNA virus is safe in patients with advanced solid tumors." *Invest New Drugs* **28**(5): 641-649.
- Groh, V., Rhinehart, R., Secrist, H., Bauer, S., Grabstein, K. H. et Spies, T. (1999) "Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 6879-6884.
- Grote, D., Russell, S. J., Cornu, T. I., Cattaneo, R., Vile, R., Poland, G. A. et Fielding, A. K. (2001) "Live attenuated measles virus induces regression of human lymphoma xenografts in immunodeficient mice." *Blood* **97**(12): 3746-3754.
- Heal, R. et McGivan, J. (1998) "Induction of calreticulin expression in response to amino acid deprivation in Chinese hamster ovary cells." *Biochem J* **329** (Pt 2)(389-394.
- Henry, F., Boisteau, O., Bretaudeau, L., Lieubeau, B., Meflah, K. et Gregoire, M. (1999) "Antigen-presenting cells that phagocytose apoptotic tumor-derived cells are potent tumor vaccines." *Cancer Res* **59**(14): 3329-3332.
- Herrero, Y. C. M., Cornelis, J. J., Herold-Mende, C., Rommelaere, J., Schlehofer, J. R. et Geletneky, K. (2004) "Parvovirus H-1 infection of human glioma cells leads to complete viral replication and efficient cell killing." *Int J Cancer* **109**(1): 76-84.
- Hilleman, M. R. (2001) "Current overview of the pathogenesis and prophylaxis of measles with focus on practical implications." *Vaccine* **20**(5-6): 651-665.
- Hirasawa, K., Nishikawa, S. G., Norman, K. L., Alain, T., Kossakowska, A. et Lee, P. W. (2002) "Oncolytic reovirus against ovarian and colon cancer." *Cancer Res* **62**(6): 1696-1701.
- Hori, O., Brett, J., Slattery, T., Cao, R., Zhang, J., Chen, J. X., Nagashima, M., Lundh, E. R., Vijay, S., Nitecki, D. et et al. (1995) "The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system." *J Biol Chem* **270**(43): 25752-25761.
- Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E. O., Kono, H., Rock, K. L., Fitzgerald, K. A. et Latz, E. (2008) "Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization." *Nat Immunol* **9**(8): 847-856.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K. K., Schlee, M., Endres, S. et Hartmann, G. (2006) "5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I." *Science* **314**(5801): 994-997.
- Hornung, V. et Latz, E. (2010) "Intracellular DNA recognition." *Nat Rev Immunol* **10**(2): 123-130.
- Hristov, G., Kramer, M., Li, J., El-Andaloussi, N., Mora, R., Daeffler, L., Zentgraf, H., Rommelaere, J. et Marchini, A. (2010) "Through its nonstructural protein NS1,

- parvovirus H-1 induces apoptosis via accumulation of reactive oxygen species." *J Virol* **84**(12): 5909-5922.
- Huang, B., Sikorski, R., Kirn, D. H. et Thorne, S. H. (2011) "Synergistic anti-tumor effects between oncolytic vaccinia virus and paclitaxel are mediated by the IFN response and HMGB1." *Gene Ther* **18**(2): 164-172.
- Huang, X. F., Ren, W., Rollins, L., Pittman, P., Shah, M., Shen, L., Gu, Q., Strube, R., Hu, F. et Chen, S. Y. (2003) "A broadly applicable, personalized heat shock protein-mediated oncolytic tumor vaccine." *Cancer Res* **63**(21): 7321-7329.
- Huppa, J. B. et Davis, M. M. (2003) "T-cell-antigen recognition and the immunological synapse." *Nat Rev Immunol* **3**(12): 973-983.
- Iankov, I. D., Msaouel, P., Allen, C., Federspiel, M. J., Bulur, P. A., Dietz, A. B., Gastineau, D., Ikeda, Y., Ingle, J. N., Russell, S. J. et Galanis, E. (2010) "Demonstration of anti-tumor activity of oncolytic measles virus strains in a malignant pleural effusion breast cancer model." *Breast Cancer Res Treat* **122**(3): 745-754.
- Ikeda, K., Ichikawa, T., Wakimoto, H., Silver, J. S., Deisboeck, T. S., Finkelstein, D., Harsh, G. R. t., Louis, D. N., Bartus, R. T., Hochberg, F. H. et Chiocca, E. A. (1999) "Oncolytic virus therapy of multiple tumors in the brain requires suppression of innate and elicited antiviral responses." *Nat Med* **5**(8): 881-887.
- Ino, Y., Saeki, Y., Fukuhara, H. et Todo, T. (2006) "Triple combination of oncolytic herpes simplex virus-1 vectors armed with interleukin-12, interleukin-18, or soluble B7-1 results in enhanced antitumor efficacy." *Clin Cancer Res* **12**(2): 643-652.
- Ishii, T., Udono, H., Yamano, T., Ohta, H., Uenaka, A., Ono, T., Hizuta, A., Tanaka, N., Srivastava, P. K. et Nakayama, E. (1999) "Isolation of MHC class I-restricted tumor antigen peptide and its precursors associated with heat shock proteins hsp70, hsp90, and gp96." *J Immunol* **162**(3): 1303-1309.
- Ito, I., Fukazawa, J. et Yoshida, M. (2007) "Post-translational methylation of high mobility group box 1 (HMGB1) causes its cytoplasmic localization in neutrophils." *J Biol Chem* **282**(22): 16336-16344.
- Iwata, K., Seya, T., Yanagi, Y., Pesando, J. M., Johnson, P. M., Okabe, M., Ueda, S., Ariga, H. et Nagasawa, S. (1995) "Diversity of sites for measles virus binding and for inactivation of complement C3b and C4b on membrane cofactor protein CD46." *J Biol Chem* **270**(25): 15148-15152.
- Jaattela, M. (1995) "Over-expression of hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells." *Int J Cancer* **60**(5): 689-693.
- Janke, M., Peeters, B., de Leeuw, O., Moorman, R., Arnold, A., Fournier, P. et Schirmacher, V. (2007) "Recombinant Newcastle disease virus (NDV) with inserted gene coding for GM-CSF as a new vector for cancer immunogene therapy." *Gene Ther* **14**(23): 1639-1649.
- Janssen, E. M., Lemmens, E. E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M. G. et Schoenberger, S. P. (2003) "CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes." *Nature* **421**(6925): 852-856.
- Jeannin, P., Jaillon, S. et Delneste, Y. (2008) "Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells." *Curr Opin Immunol* **20**(5): 530-537.
- Jelinek, I., Leonard, J. N., Price, G. E., Brown, K. N., Meyer-Manlapat, A., Goldsmith, P. K.,

- Wang, Y., Venzon, D., Epstein, S. L. et Segal, D. M. (2011) "TLR3-Specific Double-Stranded RNA Oligonucleotide Adjuvants Induce Dendritic Cell Cross-Presentation, CTL Responses, and Antiviral Protection." *J Immunol* **186**(4): 2422-2429.
- Kalinski, P., Mailliard, R. B., Giermasz, A., Zeh, H. J., Basse, P., Bartlett, D. L., Kirkwood, J. M., Lotze, M. T. et Herberman, R. B. (2005) "Natural killer-dendritic cell cross-talk in cancer immunotherapy." *Expert Opin Biol Ther* **5**(10): 1303-1315.
- Kamizono, J., Nagano, S., Murofushi, Y., Komiya, S., Fujiwara, H., Matsuishi, T. et Kosai, K. (2005) "Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus exhibits cancer-specific and efficient viral replication." *Cancer Res* **65**(12): 5284-5291.
- Kanerva, A. et Hemminki, A. (2004) "Modified adenoviruses for cancer gene therapy." *Int J Cancer* **110**(4): 475-480.
- Karp, C. L., Wysocka, M., Wahl, L. M., Ahearn, J. M., Cuomo, P. J., Sherry, B., Trinchieri, G. et Griffin, D. E. (1996) "Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus." *Science* **273**(5272): 228-231.
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K. J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C. S., Reis e Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T. et Akira, S. (2006) "Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses." *Nature* **441**(7089): 101-105.
- Katsafanas, G. C. et Moss, B. (2004) "Vaccinia virus intermediate stage transcription is complemented by Ras-GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein (G3BP) and cytoplasmic activation/proliferation-associated protein (p137) individually or as a heterodimer." *J Biol Chem* **279**(50): 52210-52217.
- Kawai, T. et Akira, S. (2010) "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." *Nat Immunol* **11**(5): 373-384.
- Kazama, H., Ricci, J. E., Herndon, J. M., Hoppe, G., Green, D. R. et Ferguson, T. A. (2008) "Induction of immunological tolerance by apoptotic cells requires caspase-dependent oxidation of high-mobility group box-1 protein." *Immunity* **29**(1): 21-32.
- Kemper, C., Chan, A. C., Green, J. M., Brett, K. A., Murphy, K. M. et Atkinson, J. P. (2003) "Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype." *Nature* **421**(6921): 388-392.
- Kepp, O., Senovilla, L., Galluzzi, L., Panaretakis, T., Tesniere, A., Schlemmer, F., Madeo, F., Zitvogel, L. et Kroemer, G. (2009) "Viral subversion of immunogenic cell death." *Cell Cycle* **8**(6): 860-869.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. et Currie, A. R. (1972) "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* **26**(4): 239-257.
- Kerrigan, A. M. et Brown, G. D. (2009) "C-type lectins and phagocytosis." *Immunobiology* **214**(7): 562-575.
- Kimata, H., Imai, T., Kikumori, T., Teshigahara, O., Nagasaka, T., Goshima, F., Nishiyama, Y. et Nakao, A. (2006) "Pilot study of oncolytic viral therapy using mutant herpes simplex virus (HF10) against recurrent metastatic breast cancer." *Ann Surg Oncol* **13**(8): 1078-1084.
- Kirn, D. H. et Thorne, S. H. (2009) "Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-

- mechanistic therapeutic class for cancer." Nat Rev Cancer **9**(1): 64-71.
- Knutson, K. L. et Disis, M. L. (2005) "Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy." Cancer Immunol Immunother **54**(8): 721-728.
- Kodaira, Y., Nair, S. K., Wrenshall, L. E., Gilboa, E. et Platt, J. L. (2000) "Phenotypic and functional maturation of dendritic cells mediated by heparan sulfate." J Immunol **165**(3): 1599-1604.
- Kojaoghlanian, T., Flomenberg, P. et Horwitz, M. S. (2003) "The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host." Rev Med Virol **13**(3): 155-171.
- Kono, H. et Rock, K. L. (2008) "How dying cells alert the immune system to danger." Nat Rev Immunol **8**(4): 279-289.
- Kramm, C. M., Rainov, N. G., Sena-Esteves, M., Barnett, F. H., Chase, M., Herrlinger, U., Pechan, P. A., Chiocca, E. A. et Breakefield, X. O. (1996) "Long-term survival in a rodent model of disseminated brain tumors by combined intrathecal delivery of herpes vectors and ganciclovir treatment." Hum Gene Ther **7**(16): 1989-1994.
- Krugman, S., Giles, J. P., Jacobs, A. M. et Friedman, H. (1962) "Studies with live attenuated measles-virus vaccine. Comparative clinical, antigenic, and prophylactic effects after inoculation with and without gamma-globulin." Am J Dis Child **103**(353-363).
- Kubo, S., Kawasaki, Y., Yamaoka, N., Tagawa, M., Kasahara, N., Terada, N. et Okamura, H. (2010) "Complete regression of human malignant mesothelioma xenografts following local injection of midkine promoter-driven oncolytic adenovirus." J Gene Med **12**(8): 681-692.
- Kunisawa, J. et Shastri, N. (2006) "Hsp90alpha chaperones large C-terminally extended proteolytic intermediates in the MHC class I antigen processing pathway." Immunity **24**(5): 523-534.
- Lapteva, N., Aldrich, M., Rollins, L., Ren, W., Goltsova, T., Chen, S. Y. et Huang, X. F. (2009) "Attraction and activation of dendritic cells at the site of tumor elicits potent antitumor immunity." Mol Ther **17**(9): 1626-1636.
- Lapteva, N., Aldrich, M., Weksberg, D., Rollins, L., Goltsova, T., Chen, S. Y. et Huang, X. F. (2009) "Targeting the intratumoral dendritic cells by the oncolytic adenoviral vaccine expressing RANTES elicits potent antitumor immunity." J Immunother **32**(2): 145-156.
- Laurie, S. A., Bell, J. C., Atkins, H. L., Roach, J., Bamat, M. K., O'Neil, J. D., Roberts, M. S., Groene, W. S. et Lorence, R. M. (2006) "A phase 1 clinical study of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, using two-step desensitization." Clin Cancer Res **12**(8): 2555-2562.
- Lee, K. M., Chuang, E., Griffin, M., Khattri, R., Hong, D. K., Zhang, W., Straus, D., Samelson, L. E., Thompson, C. B. et Bluestone, J. A. (1998) "Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4." Science **282**(5397): 2263-2266.
- Lei, N., Shen, F. B., Chang, J. H., Wang, L., Li, H., Yang, C., Li, J. et Yu, D. C. (2009) "An oncolytic adenovirus expressing granulocyte macrophage colony-stimulating factor shows improved specificity and efficacy for treating human solid tumors." Cancer Gene Ther **16**(1): 33-43.
- Lemon, K., de Vries, R. D., Mesman, A. W., McQuaid, S., van Amerongen, G., Yuksel, S., Ludlow, M., Rennick, L. J., Kuiken, T., Rima, B. K., Geijtenbeek, T. B., Osterhaus,

- A. D., Duprex, W. P. et de Swart, R. L. (2011) "Early target cells of measles virus after aerosol infection of non-human primates." *PLoS Pathog* **7**(1): e1001263.
- Leonard, V. H., Sinn, P. L., Hodge, G., Miest, T., Devaux, P., Oezguen, N., Braun, W., McCray, P. B., Jr., McChesney, M. B. et Cattaneo, R. (2008) "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* **118**(7): 2448-2458.
- Levine, B. et Yuan, J. (2005) "Autophagy in cell death: an innocent convict?" *J Clin Invest* **115**(10): 2679-2688.
- Li, J. L., Liu, H. L., Zhang, X. R., Xu, J. P., Hu, W. K., Liang, M., Chen, S. Y., Hu, F. et Chu, D. T. (2009) "A phase I trial of intratumoral administration of recombinant oncolytic adenovirus overexpressing HSP70 in advanced solid tumor patients." *Gene Ther* **16**(3): 376-382.
- Li, Z., Menoret, A. et Srivastava, P. (2002) "Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation." *Curr Opin Immunol* **14**(1): 45-51.
- Lichty, B. D., Power, A. T., Stojdl, D. F. et Bell, J. C. (2004) "Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet." *Trends Mol Med* **10**(5): 210-216.
- Lin, E. et Nemunaitis, J. (2004) "Oncolytic viral therapies." *Cancer Gene Ther* **11**(10): 643-664.
- Linderoth, N. A., Popowicz, A. et Sastry, S. (2000) "Identification of the peptide-binding site in the heat shock chaperone/tumor rejection antigen gp96 (Grp94)." *J Biol Chem* **275**(8): 5472-5477.
- Liszewski, M. K., Post, T. W. et Atkinson, J. P. (1991) "Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster." *Annu Rev Immunol* **9**(431-455).
- Liu, T. C. et Kirn, D. (2005) "Viruses with deletions in antiapoptotic genes as potential oncolytic agents." *Oncogene* **24**(40): 6069-6079.
- Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R. et Wang, X. (1996) "Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c." *Cell* **86**(1): 147-157.
- Liu, Y. et Deisseroth, A. (2006) "Oncolytic adenoviral vector carrying the cytosine deaminase gene for melanoma gene therapy." *Cancer Gene Ther* **13**(9): 845-855.
- Lorence, R. M., Katubig, B. B., Reichard, K. W., Reyes, H. M., Phuangsab, A., Sasseti, M. D., Walter, R. J. et Peeples, M. E. (1994) "Complete regression of human fibrosarcoma xenografts after local Newcastle disease virus therapy." *Cancer Res* **54**(23): 6017-6021.
- Lorence, R. M., Roberts, M. S., O'Neil, J. D., Groene, W. S., Miller, J. A., Mueller, S. N. et Bamat, M. K. (2007) "Phase 1 clinical experience using intravenous administration of PV701, an oncolytic Newcastle disease virus." *Curr Cancer Drug Targets* **7**(2): 157-167.
- Ludlow, M., Rennick, L. J., Sarlang, S., Skibinski, G., McQuaid, S., Moore, T., de Swart, R. L. et Duprex, W. P. (2010) "Wild-type measles virus infection of primary epithelial cells occurs via the basolateral surface without syncytium formation or release of infectious virus." *J Gen Virol* **91**(Pt 4): 971-979.
- Luo, C., Mori, I., Goshima, F., Ushijima, Y., Nawa, A., Kimura, H. et Nishiyama, Y. (2007)

- "Replication-competent, oncolytic herpes simplex virus type 1 mutants induce a bystander effect following ganciclovir treatment." *J Gene Med* **9**(10): 875-883.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. et Wang, X. (1998) "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." *Cell* **94**(4): 481-490.
- Luthi, A. U. et Martin, S. J. (2007) "The CASBAH: a searchable database of caspase substrates." *Cell Death Differ* **14**(4): 641-650.
- Mader, E. K., Maeyama, Y., Lin, Y., Butler, G. W., Russell, H. M., Galanis, E., Russell, S. J., Dietz, A. B. et Peng, K. W. (2009) "Mesenchymal stem cell carriers protect oncolytic measles viruses from antibody neutralization in an orthotopic ovarian cancer therapy model." *Clin Cancer Res* **15**(23): 7246-7255.
- Marcato, P., Dean, C. A., Giacomantonio, C. A. et Lee, P. W. (2009) "Oncolytic reovirus effectively targets breast cancer stem cells." *Mol Ther* **17**(6): 972-979.
- Marrack, P., Kappler, J. et Mitchell, T. (1999) "Type I interferons keep activated T cells alive." *J Exp Med* **189**(3): 521-530.
- Marriott, H. M. et Dockrell, D. H. (2006) "Streptococcus pneumoniae: the role of apoptosis in host defense and pathogenesis." *Int J Biochem Cell Biol* **38**(11): 1848-1854.
- Martinon, F., Mayor, A. et Tschopp, J. (2009) "The inflammasomes: guardians of the body." *Annu Rev Immunol* **27**(229-265).
- Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A. et Tschopp, J. (2006) "Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome." *Nature* **440**(7081): 237-241.
- Martins, I., Tesniere, A., Kepp, O., Michaud, M., Schlemmer, F., Senovilla, L., Seror, C., Metivier, D., Perfettini, J. L., Zitvogel, L. et Kroemer, G. (2009) "Chemotherapy induces ATP release from tumor cells." *Cell Cycle* **8**(22): 3723-3728.
- Matikainen, S., Paananen, A., Miettinen, M., Kurimoto, M., Timonen, T., Julkunen, I. et Sareneva, T. (2001) "IFN-alpha and IL-18 synergistically enhance IFN-gamma production in human NK cells: differential regulation of Stat4 activation and IFN-gamma gene expression by IFN-alpha and IL-12." *Eur J Immunol* **31**(7): 2236-2245.
- Matzinger, P. (1994) "Tolerance, danger, and the extended family." *Annu Rev Immunol* **12**(991-1045).
- McDonald, C. J., Erlichman, C., Ingle, J. N., Rosales, G. A., Allen, C., Greiner, S. M., Harvey, M. E., Zollman, P. J., Russell, S. J. et Galanis, E. (2006) "A measles virus vaccine strain derivative as a novel oncolytic agent against breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* **99**(2): 177-184.
- Mehta-Damani, A., Markowicz, S. et Engleman, E. G. (1994) "Generation of antigen-specific CD8+ CTLs from naive precursors." *J Immunol* **153**(3): 996-1003.
- Melcher, A., Todryk, S., Hardwick, N., Ford, M., Jacobson, M. et Vile, R. G. (1998) "Tumor immunogenicity is determined by the mechanism of cell death via induction of heat shock protein expression." *Nat Med* **4**(5): 581-587.
- Menotti, L., Nicoletti, G., Gatta, V., Croci, S., Landuzzi, L., De Giovanni, C., Nanni, P., Lollini, P. L. et Campadelli-Fiume, G. (2009) "Inhibition of human tumor growth in mice by an oncolytic herpes simplex virus designed to target solely HER-2-positive cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(22): 9039-9044.
- Messmer, D., Yang, H., Telusma, G., Knoll, F., Li, J., Messmer, B., Tracey, K. J. et Chiorazzi,

- N. (2004) "High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization." *J Immunol* **173**(1): 307-313.
- Micheau, O. et Tschopp, J. (2003) "Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes." *Cell* **114**(2): 181-190.
- Mizushima, N. (2005) "The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide." *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**(1535-1541).
- Mizushima, N. (2007) "Autophagy: process and function." *Genes Dev* **21**(22): 2861-2873.
- Moehler, M., Blechacz, B., Weiskopf, N., Zeidler, M., Stremmel, W., Rommelaere, J., Galle, P. R. et Cornelis, J. J. (2001) "Effective infection, apoptotic cell killing and gene transfer of human hepatoma cells but not primary hepatocytes by parvovirus H1 and derived vectors." *Cancer Gene Ther* **8**(3): 158-167.
- Moehler, M., Zeidler, M., Schede, J., Rommelaere, J., Galle, P. R., Cornelis, J. J. et Heike, M. (2003) "Oncolytic parvovirus H1 induces release of heat-shock protein HSP72 in susceptible human tumor cells but may not affect primary immune cells." *Cancer Gene Ther* **10**(6): 477-480.
- Moehler, M. H., Zeidler, M., Wilsberg, V., Cornelis, J. J., Woelfel, T., Rommelaere, J., Galle, P. R. et Heike, M. (2005) "Parvovirus H-1-induced tumor cell death enhances human immune response in vitro via increased phagocytosis, maturation, and cross-presentation by dendritic cells." *Hum Gene Ther* **16**(8): 996-1005.
- Moore, A. E. (1952) "Viruses with oncolytic properties and their adaptation to tumors." *Ann N Y Acad Sci* **54**(6): 945-952.
- Moran, L., Mirault, M. E., Arrigo, A. P., Goldschmidt-Clermont, M. et Tissieres, A. (1978) "Heat shock of *Drosophila melanogaster* induces the synthesis of new messenger RNAs and proteins." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **283**(997): 391-406.
- Morrison, J., Briggs, S. S., Green, N. K., Thoma, C., Fisher, K. D., Kehoe, S. et Seymour, L. W. (2009) "Cetuximab retargeting of adenovirus via the epidermal growth factor receptor for treatment of intraperitoneal ovarian cancer." *Hum Gene Ther* **20**(3): 239-251.
- Morse, D. L., Gray, H., Payne, C. M. et Gillies, R. J. (2005) "Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells." *Mol Cancer Ther* **4**(10): 1495-1504.
- Moss, W. J. et Griffin, D. E. (2006) "Global measles elimination." *Nat Rev Microbiol* **4**(12): 900-908.
- Msaouel, P., Iankov, I. D., Allen, C., Morris, J. C., von Messling, V., Cattaneo, R., Koutsilieris, M., Russell, S. J. et Galanis, E. (2009) "Engineered measles virus as a novel oncolytic therapy against prostate cancer." *Prostate* **69**(1): 82-91.
- Multhoff, G., Botzler, C., Wiesnet, M., Muller, E., Meier, T., Wilmanns, W. et Issels, R. D. (1995) "A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells." *Int J Cancer* **61**(2): 272-279.
- Mundschau, L. J. et Faller, D. V. (1994) "Endogenous inhibitors of the dsRNA-dependent eIF-2 alpha protein kinase PKR in normal and ras-transformed cells." *Biochimie* **76**(8): 792-800.
- Murphy, J. E., Tedbury, P. R., Homer-Vanniasinkam, S., Walker, J. H. et Ponnambalam, S. (2005) "Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors."

- Atherosclerosis **182**(1): 1-15.
- Myers, R., Greiner, S., Harvey, M., Soeffker, D., Frenzke, M., Abraham, K., Shaw, A., Rozenblatt, S., Federspiel, M. J., Russell, S. J. et Peng, K. W. (2005) "Oncolytic activities of approved mumps and measles vaccines for therapy of ovarian cancer." Cancer Gene Ther **12**(7): 593-599.
- Nakhaei, P., Genin, P., Civas, A. et Hiscott, J. (2009) "RIG-I-like receptors: sensing and responding to RNA virus infection." Semin Immunol **21**(4): 215-222.
- Naniche, D., Varior-Krishnan, G., Cervoni, F., Wild, T. F., Rossi, B., Rabourdin-Combe, C. et Gerlier, D. (1993) "Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus." J Virol **67**(10): 6025-6032.
- Nawa, A., Luo, C., Zhang, L., Ushijima, Y., Ishida, D., Kamakura, M., Fujimoto, Y., Goshima, F., Kikkawa, F. et Nishiyama, Y. (2008) "Non-engineered, naturally oncolytic herpes simplex virus HSV1 HF-10: applications for cancer gene therapy." Curr Gene Ther **8**(3): 208-221.
- Nettelbeck, D. M. (2008) "Cellular genetic tools to control oncolytic adenoviruses for virotherapy of cancer." J Mol Med **86**(4): 363-377.
- Ng, G., Sharma, K., Ward, S. M., Desrosiers, M. D., Stephens, L. A., Schoel, W. M., Li, T., Lowell, C. A., Ling, C. C., Amrein, M. W. et Shi, Y. (2008) "Receptor-independent, direct membrane binding leads to cell-surface lipid sorting and Syk kinase activation in dendritic cells." Immunity **29**(5): 807-818.
- Nguyen, T. L., Tumulasci, V. F., Singhroy, D., Arguello, M. et Hiscott, J. (2009) "The emergence of combinatorial strategies in the development of RNA oncolytic virus therapies." Cell Microbiol **11**(6): 889-897.
- Nieland, T. J., Tan, M. C., Monne-van Muijen, M., Koning, F., Kruisbeek, A. M. et van Bleek, G. M. (1996) "Isolation of an immunodominant viral peptide that is endogenously bound to the stress protein GP96/GRP94." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 6135-6139.
- Norman, K. L., Coffey, M. C., Hirasawa, K., Demetrick, D. J., Nishikawa, S. G., DiFrancesco, L. M., Strong, J. E. et Lee, P. W. (2002) "Reovirus oncolysis of human breast cancer." Hum Gene Ther **13**(5): 641-652.
- Obeid, M., Panaretakis, T., Joza, N., Tufi, R., Tesniere, A., van Endert, P., Zitvogel, L. et Kroemer, G. (2007) "Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis." Cell Death Differ **14**(10): 1848-1850.
- Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G. M., Apetoh, L., Perfettini, J. L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., Metivier, D., Larochette, N., van Endert, P., Ciccocanti, F., Piacentini, M., Zitvogel, L. et Kroemer, G. (2007) "Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death." Nat Med **13**(1): 54-61.
- Ogbomo, H., Michaelis, M., Geiler, J., van Rikxoort, M., Muster, T., Egorov, A., Doerr, H. W. et Cinatl, J., Jr. (2010) "Tumor cells infected with oncolytic influenza A virus prime natural killer cells for lysis of resistant tumor cells." Med Microbiol Immunol **199**(2): 93-101.
- Ogden, C. A., deCathelineau, A., Hoffmann, P. R., Bratton, D., Ghebrehiwet, B., Fadok, V. A. et Henson, P. M. (2001) "C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface

- calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells." *J Exp Med* **194**(6): 781-795.
- Oglesbee, M. J., Pratt, M. et Carsillo, T. (2002) "Role for heat shock proteins in the immune response to measles virus infection." *Viral Immunol* **15**(3): 399-416.
- Ohashi, K., Burkart, V., Flohe, S. et Kolb, H. (2000) "Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex." *J Immunol* **164**(2): 558-561.
- Oldenborg, P. A., Gresham, H. D. et Lindberg, F. P. (2001) "CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPalpha) regulates Fcgamma and complement receptor-mediated phagocytosis." *J Exp Med* **193**(7): 855-862.
- Orr, A. W., Elzie, C. A., Kucik, D. F. et Murphy-Ullrich, J. E. (2003) "Thrombospondin signaling through the calreticulin/LDL receptor-related protein co-complex stimulates random and directed cell migration." *J Cell Sci* **116**(Pt 14): 2917-2927.
- O'Shea, C. C., Johnson, L., Bagus, B., Choi, S., Nicholas, C., Shen, A., Boyle, L., Pandey, K., Soria, C., Kunich, J., Shen, Y., Habets, G., Ginzinger, D. et McCormick, F. (2004) "Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity." *Cancer Cell* **6**(6): 611-623.
- Otsuki, A., Patel, A., Kasai, K., Suzuki, M., Kurozumi, K., Chiocca, E. A. et Saeki, Y. (2008) "Histone deacetylase inhibitors augment antitumor efficacy of herpes-based oncolytic viruses." *Mol Ther* **16**(9): 1546-1555.
- Ozduman, K., Wollmann, G., Piepmeyer, J. M. et van den Pol, A. N. (2008) "Systemic vesicular stomatitis virus selectively destroys multifocal glioma and metastatic carcinoma in brain." *J Neurosci* **28**(8): 1882-1893.
- Panaretakis, T., Kepp, O., Brockmeier, U., Tesniere, A., Bjorklund, A. C., Chapman, D. C., Durchschlag, M., Joza, N., Pierron, G., van Endert, P., Yuan, J., Zitvogel, L., Madeo, F., Williams, D. B. et Kroemer, G. (2009) "Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death." *EMBO J* **28**(5): 578-590.
- Pandha, H. S., Heinemann, L., Simpson, G. R., Melcher, A., Prestwich, R., Errington, F., Coffey, M., Harrington, K. J. et Morgan, R. (2009) "Synergistic effects of oncolytic reovirus and cisplatin chemotherapy in murine malignant melanoma." *Clin Cancer Res* **15**(19): 6158-6166.
- Parato, K. A., Senger, D., Forsyth, P. A. et Bell, J. C. (2005) "Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours." *Nat Rev Cancer* **5**(12): 965-976.
- Parent du Chatelet, I., Antona, D., Freymuth, F., Muscat, M., Halftermeyer-Zhou, F., Maine, C., Floret, D. et Levy-Bruhl, D. (2010) "Spotlight on measles 2010: update on the ongoing measles outbreak in France, 2008-2010." *Euro Surveill* **15**(36):
- Park, B. H., Hwang, T., Liu, T. C., Sze, D. Y., Kim, J. S., Kwon, H. C., Oh, S. Y., Han, S. Y., Yoon, J. H., Hong, S. H., Moon, A., Speth, K., Park, C., Ahn, Y. J., Daneshmand, M., Rhee, B. G., Pinedo, H. M., Bell, J. C. et Kirn, D. H. (2008) "Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: a phase I trial." *Lancet Oncol* **9**(6): 533-542.
- Park, J. S., Arcaroli, J., Yum, H. K., Yang, H., Wang, H., Yang, K. Y., Choe, K. H., Strassheim, D., Pitts, T. M., Tracey, K. J. et Abraham, E. (2003) "Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box 1 protein." *Am J*

- Physiol Cell Physiol **284**(4): C870-879.
- Parks, C. L., Lerch, R. A., Walpita, P., Wang, H. P., Sidhu, M. S. et Udem, S. A. (2001) "Comparison of predicted amino acid sequences of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage." J Virol **75**(2): 910-920.
- Patterson, J. B., Thomas, D., Lewicki, H., Billeter, M. A. et Oldstone, M. B. (2000) "V and C proteins of measles virus function as virulence factors in vivo." Virology **267**(1): 80-89.
- Penaloza, C., Lin, L., Lockshin, R. A. et Zakeri, Z. (2006) "Cell death in development: shaping the embryo." Histochem Cell Biol **126**(2): 149-158.
- Peng, K. W., Ahmann, G. J., Pham, L., Greipp, P. R., Cattaneo, R. et Russell, S. J. (2001) "Systemic therapy of myeloma xenografts by an attenuated measles virus." Blood **98**(7): 2002-2007.
- Peng, K. W., TenEyck, C. J., Galanis, E., Kalli, K. R., Hartmann, L. C. et Russell, S. J. (2002) "Intraperitoneal therapy of ovarian cancer using an engineered measles virus." Cancer Res **62**(16): 4656-4662.
- Phuangsab, A., Lorence, R. M., Reichard, K. W., Peeples, M. E. et Walter, R. J. (2001) "Newcastle disease virus therapy of human tumor xenografts: antitumor effects of local or systemic administration." Cancer Lett **172**(1): 27-36.
- Phuong, L. K., Allen, C., Peng, K. W., Giannini, C., Greiner, S., TenEyck, C. J., Mishra, P. K., Macura, S. I., Russell, S. J. et Galanis, E. C. (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**(10): 2462-2469.
- Piao, Y., Jiang, H., Alemany, R., Krasnykh, V., Marini, F. C., Xu, J., Alonso, M. M., Conrad, C. A., Aldape, K. D., Gomez-Manzano, C. et Fueyo, J. (2009) "Oncolytic adenovirus retargeted to Delta-EGFR induces selective antiglioma activity." Cancer Gene Ther **16**(3): 256-265.
- Portugal, J., Mansilla, S. et Bataller, M. (2010) "Mechanisms of drug-induced mitotic catastrophe in cancer cells." Curr Pharm Des **16**(1): 69-78.
- Prestwich, R. J., Harrington, K. J., Pandha, H. S., Vile, R. G., Melcher, A. A. et Errington, F. (2008) "Oncolytic viruses: a novel form of immunotherapy." Expert Rev Anticancer Ther **8**(10): 1581-1588.
- Pulendran, B. et Ahmed, R. (2006) "Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development." Cell **124**(4): 849-863.
- Qiao, J., Kottke, T., Willmon, C., Galivo, F., Wongthida, P., Diaz, R. M., Thompson, J., Ryno, P., Barber, G. N., Chester, J., Selby, P., Harrington, K., Melcher, A. et Vile, R. G. (2008) "Purging metastases in lymphoid organs using a combination of antigen-nonspecific adoptive T cell therapy, oncolytic virotherapy and immunotherapy." Nat Med **14**(1): 37-44.
- Qiao, J., Wang, H., Kottke, T., White, C., Twigger, K., Diaz, R. M., Thompson, J., Selby, P., de Bono, J., Melcher, A., Pandha, H., Coffey, M., Vile, R. et Harrington, K. (2008) "Cyclophosphamide facilitates antitumor efficacy against subcutaneous tumors following intravenous delivery of reovirus." Clin Cancer Res **14**(1): 259-269.
- Ran, Z., Rayet, B., Rommelaere, J. et Faisst, S. (1999) "Parvovirus H-1-induced cell death: influence of intracellular NAD consumption on the regulation of necrosis and

- apoptosis." Virus Res **65**(2): 161-174.
- Rathinam, V. A., Jiang, Z., Waggoner, S. N., Sharma, S., Cole, L. E., Waggoner, L., Vanaja, S. K., Monks, B. G., Ganesan, S., Latz, E., Hornung, V., Vogel, S. N., Szomolanyi-Tsuda, E. et Fitzgerald, K. A. (2010) "The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses." Nat Immunol **11**(5): 395-402.
- Raykov, Z., Grekova, S., Leuchs, B., Aprahamian, M. et Rommelaere, J. (2008) "Arming parvoviruses with CpG motifs to improve their oncosuppressive capacity." Int J Cancer **122**(12): 2880-2884.
- Ren, Z., Ye, X., Fang, C., Lu, Q., Zhao, Y., Liu, F., Liang, M., Hu, F. et Chen, H. Z. (2008) "Intratumor injection of oncolytic adenovirus expressing HSP70 prolonged survival in melanoma B16 bearing mice by enhanced immune response." Cancer Biol Ther **7**(2): 191-195.
- Rendon-Mitchell, B., Ochani, M., Li, J., Han, J., Wang, H., Yang, H., Susarla, S., Czura, C., Mitchell, R. A., Chen, G., Sama, A. E. et Tracey, K. J. (2003) "IFN-gamma induces high mobility group box 1 protein release partly through a TNF-dependent mechanism." J Immunol **170**(7): 3890-3897.
- Rieder, C. L. et Maiato, H. (2004) "Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint." Dev Cell **7**(5): 637-651.
- Riley, R. C., Tannenbaum, P. L., Abbott, D. H. et Atkinson, J. P. (2002) "Cutting edge: inhibiting measles virus infection but promoting reproduction: an explanation for splicing and tissue-specific expression of CD46." J Immunol **169**(10): 5405-5409.
- Riley-Vargas, R. C., Gill, D. B., Kemper, C., Liszewski, M. K. et Atkinson, J. P. (2004) "CD46: expanding beyond complement regulation." Trends Immunol **25**(9): 496-503.
- Robertson, H. D. et Mathews, M. B. (1996) "The regulation of the protein kinase PKR by RNA." Biochimie **78**(11-12): 909-914.
- Robinson, B. W., Robinson, C. et Lake, R. A. (2001) "Localised spontaneous regression in mesothelioma -- possible immunological mechanism." Lung Cancer **32**(2): 197-201.
- Robinson, H. M., Black, E. J., Brown, R. et Gillespie, D. A. (2007) "DNA mismatch repair and Chk1-dependent centrosome amplification in response to DNA alkylation damage." Cell Cycle **6**(8): 982-992.
- Rock, K. L. et Kono, H. (2008) "The inflammatory response to cell death." Annu Rev Pathol **3**(99-126).
- Rock, K. L., Latz, E., Ontiveros, F. et Kono, H. (2010) "The sterile inflammatory response." Annu Rev Immunol **28**(321-342).
- Ross, G. M. (1999) "Induction of cell death by radiotherapy." Endocr Relat Cancer **6**(1): 41-44.
- Rouhiainen, A., Tumova, S., Valmu, L., Kalkkinen, N. et Rauvala, H. (2007) "Pivotal advance: analysis of proinflammatory activity of highly purified eukaryotic recombinant HMGB1 (amphoterin)." J Leukoc Biol **81**(1): 49-58.
- Rudd, R. M. (2010) "Malignant mesothelioma." Br Med Bull **93**(105-123).
- Russell, S. J. (2002) "RNA viruses as virotherapy agents." Cancer Gene Ther **9**(12): 961-966.
- Ryckman, C., Vandal, K., Rouleau, P., Talbot, M. et Tessier, P. A. (2003) "Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion." J Immunol **170**(6): 3233-3242.

- Salama, I., Malone, P. S., Mihaimeed, F. et Jones, J. L. (2008) "A review of the S100 proteins in cancer." Eur J Surg Oncol **34**(4): 357-364.
- Sano, H., Hsu, D. K., Yu, L., Apgar, J. R., Kuwabara, I., Yamanaka, T., Hirashima, M. et Liu, F. T. (2000) "Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages." J Immunol **165**(4): 2156-2164.
- Savina, A., Peres, A., Cebrian, I., Carmo, N., Moita, C., Hacohen, N., Moita, L. F. et Amigorena, S. (2009) "The small GTPase Rac2 controls phagosomal alkalization and antigen crosspresentation selectively in CD8(+) dendritic cells." Immunity **30**(4): 544-555.
- Scaffidi, P., Misteli, T. et Bianchi, M. E. (2002) "Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation." Nature **418**(6894): 191-195.
- Schepelmann, S. et Springer, C. J. (2006) "Viral vectors for gene-directed enzyme prodrug therapy." Curr Gene Ther **6**(6): 647-670.
- Scherpereel, A., Astoul, P., Baas, P., Berghmans, T., Clayson, H., de Vuyst, P., Dienemann, H., Galateau-Salle, F., Hennequin, C., Hillerdal, G., Le Pechoux, C., Mutti, L., Pairon, J. C., Stahel, R., van Houtte, P., van Meerbeeck, J., Waller, D. et Weder, W. (2010) "Guidelines of the European Respiratory Society and the European Society of Thoracic Surgeons for the management of malignant pleural mesothelioma." Eur Respir J **35**(3): 479-495.
- Schiff, P. B., Fant, J. et Horwitz, S. B. (1979) "Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol." Nature **277**(5698): 665-667.
- Schlueter, C., Weber, H., Meyer, B., Rogalla, P., Roser, K., Hauke, S. et Bullerdiek, J. (2005) "Angiogenetic signaling through hypoxia: HMGB1: an angiogenetic switch molecule." Am J Pathol **166**(4): 1259-1263.
- Schneider-Schaulies, S., Schneider-Schaulies, J., Niewiesk, S. et Ter Meulen, V. (2002) "Measles virus: immunomodulation and cell tropism as pathogenicity determinants." Med Microbiol Immunol **191**(2): 83-87.
- Schott, M. (2006) "Immunesurveillance by dendritic cells: potential implication for immunotherapy of endocrine cancers." Endocr Relat Cancer **13**(3): 779-795.
- Schwartzberg, P. L., Mueller, K. L., Qi, H. et Cannons, J. L. (2009) "SLAM receptors and SAP influence lymphocyte interactions, development and function." Nat Rev Immunol **9**(1): 39-46.
- Schwarz, A. J. (1962) "Preliminary tests of a highly attenuated measles vaccine." Am J Dis Child **103**(386-389).
- Sei, S., Mussio, J. K., Yang, Q. E., Nagashima, K., Parchment, R. E., Coffey, M. C., Shoemaker, R. H. et Tomaszewski, J. E. (2009) "Synergistic antitumor activity of oncolytic reovirus and chemotherapeutic agents in non-small cell lung cancer cells." Mol Cancer **8**(47).
- Selzner, N., Selzner, M., Graf, R., Ungethuen, U., Fitz, J. G. et Clavien, P. A. (2004) "Water induces autocrine stimulation of tumor cell killing through ATP release and P2 receptor binding." Cell Death Differ **11 Suppl 2**(S172-180).
- Seya, T., Hara, T., Matsumoto, M. et Akedo, H. (1990) "Quantitative analysis of membrane cofactor protein (MCP) of complement. High expression of MCP on human leukemia cell lines, which is down-regulated during cell differentiation." J Immunol

- 145(1):** 238-245.
- Sha, Y., Zmijewski, J., Xu, Z. et Abraham, E. (2008) "HMGB1 develops enhanced proinflammatory activity by binding to cytokines." *J Immunol* **180(4)**: 2531-2537.
- Sharkey, R. M. et Goldenberg, D. M. (2008) "Use of antibodies and immunoconjugates for the therapy of more accessible cancers." *Adv Drug Deliv Rev* **60(12)**: 1407-1420.
- Shen, Y. et Nemunaitis, J. (2006) "Herpes simplex virus 1 (HSV-1) for cancer treatment." *Cancer Gene Ther* **13(11)**: 975-992.
- Shi, W., Tang, Q., Chen, X., Cheng, P., Jiang, P., Jing, X., Chen, P., Wang, Y., Wei, Y. et Wen, Y. (2009) "Antitumor and antimetastatic activities of vesicular stomatitis virus matrix protein in a murine model of breast cancer." *J Mol Med* **87(5)**: 493-506.
- Shi, Y., Evans, J. E. et Rock, K. L. (2003) "Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells." *Nature* **425(6957)**: 516-521.
- Shin, E. J., Wanna, G. B., Choi, B., Aguila, D., 3rd, Ebert, O., Genden, E. M. et Woo, S. L. (2007) "Interleukin-12 expression enhances vesicular stomatitis virus oncolytic therapy in murine squamous cell carcinoma." *Laryngoscope* **117(2)**: 210-214.
- Silberhumer, G. R., Brader, P., Wong, J., Serganova, I. S., Gonen, M., Gonzalez, S. J., Blasberg, R., Zamarin, D. et Fong, Y. (2010) "Genetically engineered oncolytic Newcastle disease virus effectively induces sustained remission of malignant pleural mesothelioma." *Mol Cancer Ther* **9(10)**: 2761-2769.
- Silva, M. T. (2010) "Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program." *FEBS Lett* **584(22)**: 4491-4499.
- Simon, T., Fonteneau, J. F. et Gregoire, M. (2009) "Dendritic cell preparation for immunotherapeutic interventions." *Immunotherapy* **1(2)**: 289-302.
- Sims, G. P., Rowe, D. C., Rietdijk, S. T., Herbst, R. et Coyle, A. J. (2010) "HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer." *Annu Rev Immunol* **28**(367-388).
- Smith, E. C., Popa, A., Chang, A., Masante, C. et Dutch, R. E. (2009) "Viral entry mechanisms: the increasing diversity of paramyxovirus entry." *FEBS J* **276(24)**: 7217-7227.
- Sorokin, A. V., Kim, E. R. et Ovchinnikov, L. P. (2009) "Proteasome system of protein degradation and processing." *Biochemistry (Mosc)* **74(13)**: 1411-1442.
- Srivastava, P. K., DeLeo, A. B. et Old, L. J. (1986) "Tumor rejection antigens of chemically induced sarcomas of inbred mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83(10)**: 3407-3411.
- Srivastava, P. K., Udono, H., Blachere, N. E. et Li, Z. (1994) "Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming." *Immunogenetics* **39(2)**: 93-98.
- Steele, L., Errington, F., Prestwich, R., Ilett, E., Harrington, K., Pandha, H., Coffey, M., Selby, P., Vile, R. et Melcher, A. (2011) "Pro-inflammatory cytokine/chemokine production by reovirus treated melanoma cells is PKR/NF-kappaB mediated and supports innate and adaptive anti-tumour immune priming." *Mol Cancer* **10(20)**.
- Sutrias-Grau, M., Bianchi, M. E. et Bernues, J. (1999) "High mobility group protein 1 interacts specifically with the core domain of human TATA box-binding protein and interferes with transcription factor IIB within the pre-initiation complex." *J Biol Chem* **274(3)**: 1628-1634.
- Svajger, U., Anderluh, M., Jeras, M. et Obermajer, N. (2010) "C-type lectin DC-SIGN: an adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in

- immunity." *Cell Signal* **22**(10): 1397-1405.
- Takaku, S., Terabe, M., Ambrosino, E., Peng, J., Lonning, S., McPherson, J. M. et Berzofsky, J. A. (2010) "Blockade of TGF-beta enhances tumor vaccine efficacy mediated by CD8(+) T cells." *Int J Cancer* **126**(7): 1666-1674.
- Takaoka, A., Wang, Z., Choi, M. K., Yanai, H., Negishi, H., Ban, T., Lu, Y., Miyagishi, M., Kodama, T., Honda, K., Ohba, Y. et Taniguchi, T. (2007) "DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response." *Nature* **448**(7152): 501-505.
- Takeda, M., Tahara, M., Hashiguchi, T., Sato, T. A., Jinnouchi, F., Ueki, S., Ohno, S. et Yanagi, Y. (2007) "A human lung carcinoma cell line supports efficient measles virus growth and syncytium formation via a SLAM- and CD46-independent mechanism." *J Virol* **81**(21): 12091-12096.
- Takeuchi, K., Takeda, M., Miyajima, N., Ami, Y., Nagata, N., Suzaki, Y., Shahnewaz, J., Kadota, S. et Nagata, K. (2005) "Stringent requirement for the C protein of wild-type measles virus for growth both in vitro and in macaques." *J Virol* **79**(12): 7838-7844.
- Tao, W., South, V. J., Zhang, Y., Davide, J. P., Farrell, L., Kohl, N. E., Sepp-Lorenzino, L. et Lobell, R. B. (2005) "Induction of apoptosis by an inhibitor of the mitotic kinesin KSP requires both activation of the spindle assembly checkpoint and mitotic slippage." *Cancer Cell* **8**(1): 49-59.
- Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K. et Yanagi, Y. (2000) "SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus." *Nature* **406**(6798): 893-897.
- Terabe, M., Ambrosino, E., Takaku, S., O'Konek, J. J., Venzon, D., Lonning, S., McPherson, J. M. et Berzofsky, J. A. (2009) "Synergistic enhancement of CD8+ T cell-mediated tumor vaccine efficacy by an anti-transforming growth factor-beta monoclonal antibody." *Clin Cancer Res* **15**(21): 6560-6569.
- Termeer, C., Benedix, F., Sleeman, J., Fieber, C., Voith, U., Ahrens, T., Miyake, K., Freudenberg, M., Galanos, C. et Simon, J. C. (2002) "Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4." *J Exp Med* **195**(1): 99-111.
- Thomas, M. A., Spencer, J. F., Toth, K., Sagartz, J. E., Phillips, N. J. et Wold, W. S. (2008) "Immunosuppression enhances oncolytic adenovirus replication and antitumor efficacy in the Syrian hamster model." *Mol Ther* **16**(10): 1665-1673.
- Thorne, S. H., Hwang, T. H., O'Gorman, W. E., Bartlett, D. L., Sei, S., Kanji, F., Brown, C., Werier, J., Cho, J. H., Lee, D. E., Wang, Y., Bell, J. et Kirn, D. H. (2007) "Rational strain selection and engineering creates a broad-spectrum, systemically effective oncolytic poxvirus, JX-963." *J Clin Invest* **117**(11): 3350-3358.
- Thorsteinsson, L., O'Dowd, G. M., Harrington, P. M. et Johnson, P. M. (1998) "The complement regulatory proteins CD46 and CD59, but not CD55, are highly expressed by glandular epithelium of human breast and colorectal tumour tissues." *APMIS* **106**(9): 869-878.
- Tian, J., Avalos, A. M., Mao, S. Y., Chen, B., Senthil, K., Wu, H., Parroche, P., Drabic, S., Golenbock, D., Sirois, C., Hua, J., An, L. L., Audoly, L., La Rosa, G., Bierhaus, A., Naworth, P., Marshak-Rothstein, A., Crow, M. K., Fitzgerald, K. A., Latz, E., Kiener, P. A. et Coyle, A. J. (2007) "Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-

- containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE." Nat Immunol **8**(5): 487-496.
- Tissieres, A., Mitchell, H. K. et Tracy, U. M. (1974) "Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs." J Mol Biol **85**(3): 389-398.
- Tobiasova-Czetoova, Z., Palmborg, A., Lundqvist, A., Karlsson, G., Adamson, L., Bartunkova, J., Masucci, G. et Pisa, P. (2005) "Effects of human plasma proteins on maturation of monocyte-derived dendritic cells." Immunol Lett **100**(2): 113-119.
- Toth, K., Dhar, D. et Wold, W. S. (2010) "Oncolytic (replication-competent) adenoviruses as anticancer agents." Expert Opin Biol Ther **10**(3): 353-368.
- Trinchieri, G. (2003) "Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity." Nat Rev Immunol **3**(2): 133-146.
- Trombetta, E. S. et Mellman, I. (2005) "Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo." Annu Rev Immunol **23**(975-1028).
- Tsan, M. F. et Gao, B. (2009) "Heat shock proteins and immune system." J Leukoc Biol **85**(6): 905-910.
- Udono, H., Ichiyanagi, T., Mizukami, S. et Imai, T. (2009) "Heat shock proteins in antigen trafficking--implications on antigen presentation to T cells." Int J Hyperthermia **25**(8): 617-625.
- Udono, H., Levey, D. L. et Srivastava, P. K. (1994) "Cellular requirements for tumor-specific immunity elicited by heat shock proteins: tumor rejection antigen gp96 primes CD8+ T cells in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(8): 3077-3081.
- Ulloa, L. et Messmer, D. (2006) "High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe." Cytokine Growth Factor Rev **17**(3): 189-201.
- Urbonaviciute, V., Furnrohr, B. G., Meister, S., Munoz, L., Heyder, P., De Marchis, F., Bianchi, M. E., Kirschning, C., Wagner, H., Manfredi, A. A., Kalden, J. R., Schett, G., Rovere-Querini, P., Herrmann, M. et Voll, R. E. (2008) "Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1-nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE." J Exp Med **205**(13): 3007-3018.
- Vabulas, R. M., Ahmad-Nejad, P., da Costa, C., Miethke, T., Kirschning, C. J., Hacker, H. et Wagner, H. (2001) "Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells." J Biol Chem **276**(33): 31332-31339.
- Vakifahmetoglu, H., Olsson, M. et Zhivotovsky, B. (2008) "Death through a tragedy: mitotic catastrophe." Cell Death Differ **15**(7): 1153-1162.
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T. et Kroemer, G. (2010) "Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(10): 700-714.
- Vandivier, R. W., Ogden, C. A., Fadok, V. A., Hoffmann, P. R., Brown, K. K., Botto, M., Walport, M. J., Fisher, J. H., Henson, P. M. et Greene, K. E. (2002) "Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex." J Immunol **169**(7): 3978-3986.
- Vidal, L., Pandha, H. S., Yap, T. A., White, C. L., Twigger, K., Vile, R. G., Melcher, A., Coffey, M., Harrington, K. J. et DeBono, J. S. (2008) "A phase I study of intravenous

- oncolytic reovirus type 3 Dearing in patients with advanced cancer." Clin Cancer Res **14**(21): 7127-7137.
- Vogel, C. L., Cobleigh, M. A., Tripathy, D., Gutheil, J. C., Harris, L. N., Fehrenbacher, L., Slamon, D. J., Murphy, M., Novotny, W. F., Burchmore, M., Shak, S., Stewart, S. J. et Press, M. (2002) "Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer." J Clin Oncol **20**(3): 719-726.
- Wallin, R. P., Lundqvist, A., More, S. H., von Bonin, A., Kiessling, R. et Ljunggren, H. G. (2002) "Heat-shock proteins as activators of the innate immune system." Trends Immunol **23**(3): 130-135.
- Wang, F., Ma, Y., Barrett, J. W., Gao, X., Loh, J., Barton, E., Virgin, H. W. et McFadden, G. (2004) "Disruption of Erk-dependent type I interferon induction breaks the myxoma virus species barrier." Nat Immunol **5**(12): 1266-1274.
- Wang, G., Barrett, J. W., Stanford, M., Werden, S. J., Johnston, J. B., Gao, X., Sun, M., Cheng, J. Q. et McFadden, G. (2006) "Infection of human cancer cells with myxoma virus requires Akt activation via interaction with a viral ankyrin-repeat host range factor." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(12): 4640-4645.
- Wang, H., Bloom, O., Zhang, M., Vishnubhakat, J. M., Ombrellino, M., Che, J., Frazier, A., Yang, H., Ivanova, S., Borovikova, L., Manogue, K. R., Faist, E., Abraham, E., Andersson, J., Andersson, U., Molina, P. E., Abumrad, N. N., Sama, A. et Tracey, K. J. (1999) "HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice." Science **285**(5425): 248-251.
- Wang, H., Ward, M. F., Fan, X. G., Sama, A. E. et Li, W. (2006) "Potential role of high mobility group box 1 in viral infectious diseases." Viral Immunol **19**(1): 3-9.
- Wang, L., Du, F. et Wang, X. (2008) "TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways." Cell **133**(4): 693-703.
- Warger, T., Hilf, N., Rechtsteiner, G., Haselmayer, P., Carrick, D. M., Jonuleit, H., von Landenberg, P., Rammensee, H. G., Nicchitta, C. V., Radsak, M. P. et Schild, H. (2006) "Interaction of TLR2 and TLR4 ligands with the N-terminal domain of Gp96 amplifies innate and adaptive immune responses." J Biol Chem **281**(32): 22545-22553.
- Weaver, B. A. et Cleveland, D. W. (2005) "Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death." Cancer Cell **8**(1): 7-12.
- Whittall, T., Wang, Y., Younson, J., Kelly, C., Bergmeier, L., Peters, B., Singh, M. et Lehner, T. (2006) "Interaction between the CCR5 chemokine receptors and microbial HSP70." Eur J Immunol **36**(9): 2304-2314.
- Williams, M. A. et Bevan, M. J. (2007) "Effector and memory CTL differentiation." Annu Rev Immunol **25**(171-192).
- Wilson, N. S., Dixit, V. et Ashkenazi, A. (2009) "Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks." Nat Immunol **10**(4): 348-355.
- Wiman, K. G. (2006) "Strategies for therapeutic targeting of the p53 pathway in cancer." Cell Death Differ **13**(6): 921-926.
- Wolfson, L. J., Strebel, P. M., Gacic-Dobo, M., Hoekstra, E. J., McFarland, J. W. et Hersh, B.

- S. (2007) "Has the 2005 measles mortality reduction goal been achieved? A natural history modelling study." Lancet **369**(9557): 191-200.
- Wongthida, P., Diaz, R. M., Pulido, C., Rommelfanger, D., Galivo, F., Kaluza, K., Thompson, J., Melcher, A. et Vile, R. G. (2011) "Activating Systemic T Cell Immunity Against Self Tumor Antigens to Support Oncolytic Virotherapy with VSV." Hum Gene Ther
- Worschech, A., Chen, N., Yu, Y. A., Zhang, Q., Pos, Z., Weibel, S., Raab, V., Sabatino, M., Monaco, A., Liu, H., Monsurro, V., Buller, R. M., Stroncek, D. F., Wang, E., Szalay, A. A. et Marincola, F. M. (2009) "Systemic treatment of xenografts with vaccinia virus GLV-1h68 reveals the immunologic facet of oncolytic therapy." BMC Genomics **10**(301).
- Worschech, A., Haddad, D., Stroncek, D. F., Wang, E., Marincola, F. M. et Szalay, A. A. (2009) "The immunologic aspects of poxvirus oncolytic therapy." Cancer Immunol Immunother **58**(9): 1355-1362.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. et Currie, A. R. (1980) "Cell death: the significance of apoptosis." Int Rev Cytol **68**(251-306).
- Yaacov, B., Eliahoo, E., Lazar, I., Ben-Shlomo, M., Greenbaum, I., Panet, A. et Zakay-Rones, Z. (2008) "Selective oncolytic effect of an attenuated Newcastle disease virus (NDV-HUJ) in lung tumors." Cancer Gene Ther **15**(12): 795-807.
- Yamamoto, M. et Curiel, D. T. (2010) "Current issues and future directions of oncolytic adenoviruses." Mol Ther **18**(2): 243-250.
- Yanagi, Y., Takeda, M. et Ohno, S. (2006) "Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis." J Gen Virol **87**(Pt 10): 2767-2779.
- Yang, D., Chen, Q., Yang, H., Tracey, K. J., Bustin, M. et Oppenheim, J. J. (2007) "High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin." J Leukoc Biol **81**(1): 59-66.
- Yang, M., Cao, X., Yu, M. C., Gu, J. F., Shen, Z. H., Ding, M., Yu de, B., Zheng, S. et Liu, X. (2008) "Potent antitumor efficacy of ST13 for colorectal cancer mediated by oncolytic adenovirus via mitochondrial apoptotic cell death." Hum Gene Ther **19**(4): 343-353.
- Ye, Z. et Gan, Y. H. (2007) "Flagellin contamination of recombinant heat shock protein 70 is responsible for its activity on T cells." J Biol Chem **282**(7): 4479-4484.
- Yegutkin, G. G. (2008) "Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade." Biochim Biophys Acta **1783**(5): 673-694.
- Yew, P. R. et Berk, A. J. (1992) "Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein." Nature **357**(6373): 82-85.
- Youle, R. J. et Strasser, A. (2008) "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(1): 47-59.
- Youn, J. H. et Shin, J. S. (2006) "Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion." J Immunol **177**(11): 7889-7897.
- Yu, L., Strandberg, L. et Lenardo, M. J. (2008) "The selectivity of autophagy and its role in cell death and survival." Autophagy **4**(5): 567-573.
- Zamai, L., Ponti, C., Mirandola, P., Gobbi, G., Papa, S., Galeotti, L., Cocco, L. et Vitale, M. (2007) "NK cells and cancer." J Immunol **178**(7): 4011-4016.

Bibliographie

- Zamarin, D., Vigil, A., Kelly, K., Garcia-Sastre, A. et Fong, Y. (2009) "Genetically engineered Newcastle disease virus for malignant melanoma therapy." Gene Ther **16**(6): 796-804.
- Zappavigna, V., Falciola, L., Helmer-Citterich, M., Mavilio, F. et Bianchi, M. E. (1996) "HMG1 interacts with HOX proteins and enhances their DNA binding and transcriptional activation." EMBO J **15**(18): 4981-4991.
- Zhang, X., Komaki, R., Wang, L., Fang, B. et Chang, J. Y. (2008) "Treatment of radioresistant stem-like esophageal cancer cells by an apoptotic gene-armed, telomerase-specific oncolytic adenovirus." Clin Cancer Res **14**(9): 2813-2823.
- Zitvogel, L., Kepp, O., Senovilla, L., Menger, L., Chaput, N. et Kroemer, G. (2010) "Immunogenic tumor cell death for optimal anticancer therapy: the calreticulin exposure pathway." Clin Cancer Res **16**(12): 3100-3104.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X. et Wang, X. (1999) "An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9." J Biol Chem **274**(17): 11549-11556.

ANNEXES



For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

New perspectives in cancer virotherapy: bringing the immune system into play

Despite constant advances in medically orientated cancer studies, conventional treatments by surgery, chemotherapy or radiotherapy remain partly ineffective against numerous cancers. Oncolytic virotherapy – the use of replication-competent viruses that specifically target tumor cells – has opened up new perspectives for improved treatment of these pathologies. Certain viruses demonstrate a natural, preferential tropism for tumor cells, while others can be genetically modified to show such an effect. Several of these viruses have already been used in preclinical and clinical trials in different tumor models; these studies have provided encouraging results and, thus, confirm the growing interest presented by this therapeutic strategy. The role of the immune system in the efficacy of cancer virotherapy has been poorly documented for a long time; however, several recent reports have presented evidence of synergistic effects between both direct viral oncolysis and the activation of specific, anti-tumor immune responses. These findings offer an exciting outlook for the future of cancer virotherapy.

KEYWORDS: cancer immunity cancer virotherapy cytokine oncolytic virus RNA virus

Continued improvements in the conventional treatment of cancers (i.e., surgery, chemotherapy and radiotherapy) have allowed constant advances in the battle against these diseases. Nevertheless, for certain patients, and more generally for certain types of cancer, these methods of treatment have shown themselves to be inadequate. During the last decade, a variety of new therapeutic strategies have been developed in order to respond better to these pathologies. Many research groups have focused their work on these new fields of interest, for example, on the influence of the tumor microenvironment through the development of antiangiogenic agents or by studying the role of the extracellular matrix [1], on the set up of anti-tumor immunotherapeutic protocols with injection of T lymphocytes, dendritic cells (DCs) or cytokines [2], or on the development of targeted therapies, thereby allowing one to envision a better management of the potential adverse effects on healthy tissues.

The virotherapy of cancers has emerged very recently as a credible alternative to conventional treatments. Although some observations dating from the 1950s had already shown the implication of certain viruses in spectacular cases of tumor eradication [3], this new sphere of research has exploded due to better knowledge of viral biology and to major improvements in the production of recombinant viral vectors for gene therapy. The use of replicative viruses as

anti-tumor therapeutic agents depends on the observation that certain viruses replicate preferentially in tumor cells; by contrast, normal nontransformed cells remain barely sensitive or insensitive to infection by these 'oncolytic viruses'. In fact, such viruses harness cell alterations that appear during tumor transformation and can affect mechanisms associated with the cell response to viral infection – that is, the expression of surface molecules used as entry receptors or antiviral response signaling such as the interferon pathway [4]. Since these defense mechanisms remain, in contrast, functional in normal cells, the latter are theoretically more resistant to infection.

Numerous *in vitro* studies have demonstrated the potential efficacy of several oncolytic viruses against a wide variety of tumor types, and certain Phase I and II clinical trials report encouraging results *in vivo*. These different studies, some of which are detailed in the following section, confirm the attraction for the future use of oncolytic viruses in therapeutic protocols of anti-tumor virotherapy.

In the first two parts of this article, we will focus on the major RNA and DNA viruses that have already been demonstrated to be naturally oncolytic, or which have acquired such properties through genetic engineering.

Since little is known about the role of the immune system in the therapeutic effects of oncolytic viruses, in the last part of the article

Nicolas Boisgerault¹,
Frédéric Tangy¹
& Marc Gregoire¹

¹Author for correspondence:
¹Inserm, U892, CRCNA, IRTUN,
8 quai Moncausse, BP70721,
44007 Nantes Cedex 3, France
Tel.: +33 228 080 237
Fax: +33 228 080 204
marc.gregoire@nantes.inserm.fr
²Pasteur Institute, IGVV,
28 rue du Docteur Roux,
75015 Paris, France
Tel.: +33 145 688 770
Fax: +33 140 613 367
ftangy@pasteur.fr

future
medicine part of fsg

we will try to give an extensive overview of how cancer virotherapy can be improved by implicating the host immune system, in order to develop a complete response against cancer cells and, thus, to improve the therapeutic efficacy of such treatment.

Major oncolytic viruses

■ RNA viruses

Among the different oncolytic viruses that have been used in preliminary studies, a large number belong to the family of RNA viruses [5]. Some of these viruses are of particular interest owing to their replication cycle, where dsRNA molecules form. Within an infected cell, dsRNA molecules activate the PKR protein kinase, which, on the one hand, induces the production of type I interferon that triggers the bringing into play of antiviral defenses in adjacent cells, and on the other hand activates apoptosis and allows the dispersion of the virus to the exterior of the infected cell. Deficiencies in tumor cells at the level of these antiviral mechanisms, while such are maintained in healthy cells, explain the preferential tropism of various RNA viruses for cancerous cells, and thus their potential as oncolytic viruses.

Newcastle disease virus (NDV), vesicular stomatitis virus (VSV) and measles virus (MV) are among the most studied of the RNA oncolytic viruses. It has been shown that attenuated replicative strains of these viruses are, effectively, capable of preferentially and efficiently infecting human tumor cells *in vitro* and *in vivo* in murine models of human cancer xenografts. This part of the article focuses principally on these three viruses.

Newcastle disease virus

The oncolytic potential of the paramyxovirus NDV against a wide variety of human tumors has been demonstrated by different studies performed during the last 20 years [6,7]. More recently, an elegant piece of work by Elankumaran *et al.* better characterized the way in which NDV exerts its oncolytic activity using discrete, caspase-dependent pathways to trigger a specific apoptosis as an end point in tumor cells [8].

Different, attenuated oncolytic strains of the NDV have been used in clinical trials, providing exciting information on the future potential of NDV. The naturally attenuated PV701 strain has been tested in some Phase I clinical trials on advanced solid cancers [9]; extremely encouraging results were obtained,

including cases of complete and partial remission, accompanied only by relatively minor side-effects – for example, influenza-like symptoms, tumor-site-specific adverse events and infusion reaction. Encouragingly, new strategies of injection appear to be able to significantly reduce these side effects [10,11], and Phase II results are awaited.

The second NDV strain displaying an interesting oncolytic activity is the lentogenic NDV-HUJ virus. In a Phase I/II trial, of which the results were published in 2006, this virus exhibited anti-tumor efficacy in patients with glioblastoma multiforme, a cancer that was not previously tested in trials involving PV701 [12]. One patient out of eleven achieved a complete response. This reported positive result and the slight side effects observed open new perspectives as NDV is found to be selectively oncolytic against a growing number of tumor types, including lung cancer cells [13].

Vesicular stomatitis virus

The VSV has been broadly demonstrated as oncolytic against different types of tumors [14]. Since VSV appears to be very sensitive to interferon response triggered by viral infection, it is considered to be most applicable for use in tumors where the interferon pathway appears to be defective [15]. As demonstrated recently [16], inhibition of the MAPK pathway can restore the interferon response and partially inhibit infection by VSV. Considering that approximately 30% of cancers show a constitutive activation of the MAPK pathway, VSV is becoming a very interesting potential oncolytic virus against a wide range of tumors.

It would be a mistake to limit the scope of interest only to the specificity of VSV for interferon-defective cells, since other studies have described alternative mechanisms that lead to VSV tumor selectivity, such as an inactivation of p53 [17]. Moreover, the entry receptor of the virus remains unidentified and tumor selectivity by this mechanism should be investigated. In addition, one group of researchers has recently demonstrated that a particular strain exhibits enhanced binding and internalization in glioma cells compared with normal astrocytes [18].

Interestingly, the matrix protein of VSV seems to have intrinsic anti-tumor activity. Shi *et al.* found that this protein can induce the apoptosis of primary and metastatic cells in a murine model of breast cancer without the intervention of any other viral components [19]. As the use of viruses can be associated with

major safety problems, the possibility of using a virus-derived anti-tumor protein alone appears to be very encouraging. Insertion of this protein into other viral vectors could also be envisioned.

Measles virus

The live, attenuated vaccine directed against measles disease is one of the most effective and safe human vaccines known to exist to date. It has been administered to hundreds of millions of children since the end of the 1960s and vaccination campaigns have been extremely efficient in the control of the measles disease in developed countries.

Attenuated vaccine strains of MV are derived from the Edmonston strain, adapted to cell culture *in vitro*. These strains use two distinct receptors for cell entry; they have conserved the receptor shared with the wild-type MV strain, the signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) protein principally expressed on the surface of immune cells, but have also acquired the capacity to use the CD46 molecule [20]. CD46 is a membrane protein of the complement regulation pathway, which allows cells to protect themselves from attack by participating in the inactivation of C3b and C4b components. This molecule is overexpressed in many types of tumors, thus conferring a protection against attack by complement, and through it a selective advantage [21]. Hence, in parallel to their resistance to complement, tumor cells that overexpress CD46 also become more susceptible to infection by the vaccine strains of MV [22]. Several studies have demonstrated that tumor cells derived from lymphomas, myelomas, gliomas, glioblastomas, ovarian carcinomas or breast cancers are more susceptible to infection by the vaccine strains of MV than are cells from healthy tissues [23]. One Phase I trial on cutaneous T-cell lymphomas has been carried out [24], showing regression of tumor lesions in human patients. In addition, in the Mayo Clinic (Rochester, MN, USA), several clinical trials are currently underway, particularly concerning glioblastoma, multiple myelomas and ovarian cancers [201].

The last, but equally important, advantage of MV is its genetic stability, as reversion of vaccine strains to pathogenic forms has never been observed. Hence, owing to the use of attenuated vaccine strains, and also of its low mutation frequency, MV demonstrates an unquestionable safety profile for application in future therapeutic protocols.

Reovirus

Reovirus also appears to be a very promising oncolytic viral agent, as it has been shown to infect, preferentially, tumor cells with a constitutively activated Ras pathway. This induces an inhibition of PKR by an endogenous protein inhibitor [25]. Oncolytic activity of reovirus was observed against numerous cancer types, including breast [26], lymphoma [27], ovarian and colon cancers [28]. More recently, reovirus was also shown to efficiently infect and kill breast cancer stem cells in immunocompromised mice [29].

Reovirus is also being studied in combination with chemotherapeutic treatments. Reovirus type 3 Dearing strain, in particular, Reolysin® (Oncolytics Biotech Inc., Canada), was demonstrated to act synergistically with cisplatin against human and murine melanoma [30], and with cisplatin, gemcitabine, vinblastine or paclitaxel against human non-small-cell lung cancer cells [31]. A number of different Phase I and II clinical trials using Reolysin are currently ongoing [202]. Two of these trials have been recently published; one was carried out on patients with advanced cancers and did not show severe toxicity [32], the other one reported 45 % overall clinical benefit in patients with solid advanced cancers [33].

Furthermore, reoviruses are considered to cause only minor diseases, including mild and subclinical cases, and therefore are considered to be benign viruses. Moreover, the importance of the immune system in the oncolytic efficacy of reovirus *in vivo* has been noted in several studies. Prestwich *et al.* demonstrated the essential role of immune-mediated anti-tumor activity for the therapeutic efficacy of reovirus [34]. The role of the immune system will be further discussed below.

Alternative RNA oncolytic viruses

Owing to their specificities, many RNA viruses exhibit potential oncolytic characteristics. It would not be possible to discuss each virus in detail in this article. However, in order to give a representative overview of the field, we can, for example, cite the mumps virus or poliovirus that display promising properties and with which encouraging results have already been obtained [28,35,36].

■ DNA viruses

RNA viruses are not the only oncolysis-competent viral agents. Some DNA viruses also demonstrate natural oncolytic properties. We should mention here that two examples of important DNA viruses exhibiting natural oncolytic potency. The first one is the parvovirus H-1, which was recently shown

to efficiently cause specific necrosis of Burkitt's lymphoma cells *in vitro* and in an SCID mouse model, whereas such cells were resistant to apoptosis triggered by rituximab [37]. Another example is herpes virus HF10, which is used in clinical trials for the treatment of solid tumors outside the brain, owing to its low neuroinvasiveness but significant neurovirulence [38]. HF10 was tested in patients with recurrent breast cancer [39] and in patients with advanced head and neck squamous cell carcinoma [40]. The HF10 viral strain exhibited selective cytotoxicity toward tumor cells while normal cells were left uninfected, hence no important adverse effects were observed.

As in most cases, viral strains of adenoviruses, herpes simplex viruses (HSV), vaccinia viruses or poxviruses do not naturally replicate preferentially in tumor cells, such viruses need to be genetically engineered in order to achieve an effective oncolytic activity. The second part of this article is dedicated to engineered viruses and detailed examples will be described in the following section.

Improvements in oncolytic properties

Oncolytic viruses can be either viruses with a natural capacity to replicate preferentially in tumor cells owing to their adaptation, or viruses genetically engineered such that they possess this property.

The wide variety of "natural" oncolytic viruses offers, in theory, various possibilities to manage cancer diseases. Nevertheless, as it seems utopian to find an ideal oncolytic agent among the pre-existing viruses, many studies have focused on the genetic engineering of viral vectors in order to build oncolytic viruses that are better adapted to cancer therapy.

The major issue remains the search for high tumor specificity, in order to achieve an efficient targeting of tumor cells while leaving normal healthy cells unharmed. The second challenge is to find a viral agent that is actually cytotoxic; this is a central point that will assure the pertinence of using viruses in anti-tumor therapeutic protocols. Finally, in order to achieve a complete clinical strategy, an oncolytic virus that would elicit a specific anti-tumor immune response would greatly improve the direct and long-term efficacy of the treatment [41].

DNA oncolytic viruses previously cited, such as adenoviruses, the vaccinia virus [42] or viruses of the *Herpesviridae* family, have undergone studies in which genetic modifications have been introduced in order to display

significant, oncolytic properties. Some RNA viruses (e.g., VSV and MV) are, thus, capable of expressing such additional genes within their genomes, without the modifications proving to be an obstacle to their replication or to their oncolytic activity.

■ The challenge of specificity

Genetic modification of viruses for cancer virotherapy serves primarily to improve the specificity of viruses against tumor cells, by targeting a particular surface molecule, deleting viral genes required for replication in healthy cells, or by using viral promoters that are only activated in tumor cells [43]. The major issue raised by several anticancer therapeutic strategies is the assurance that healthy tissues remain, at least relatively, unharmed. This point is considered to be central to any field of anticancer research, especially chemotherapy and radiotherapy.

Receptor targeting

The question of specific receptor targeting is well exemplified by the case of adenoviruses. Adenoviral vectors are widely used in gene therapy due to their large capacity to be modified by the insertion of additional sequences into their genome. The adenoviral oncolytic strains are exclusively derived from type 5 adenoviruses, but unfortunately, their specificity for tumor cells remains very unsatisfying, as the coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) is poorly expressed on the majority of primary tumor cells and basally expressed on the healthy ones [44]. This lack of specificity towards tumor cells requires an enhanced targeting that might be achieved through genetic engineering.

As is the case for adenoviruses, some other viruses fail to exhibit an oncolytic potential owing to a nonspecific targeting of tumor cells. In this way, the general strategy consists of targeting cancer cell-specific receptors. Nevertheless, there are difficulties in modifying viruses, as their biology is finely regulated by a complex structural conformation. In an exhaustive review on this subject, Wachler *et al.* discriminated three major strategies in order to bypass problems of tumor specificity by modifying the viral vectors: pseudotyping, which consists of the replacement of viral attachment proteins by other proteins from different viruses; the use of adaptor molecules; and genetic engineering of targeting ligands [45].

There are many examples where retargeted viruses have been used in preclinical and clinical studies. As an illustrative example, a strain

of HSV-1 was recently modified in order to specifically target cells positive for HER2 [46], a protein that is mainly expressed on metastatic mammary and ovarian carcinoma cells. The virion attachment protein was actually replaced by a specific, anti-HER2 single-chain antibody. Injection in mice strongly inhibited the growth of HER2-positive tumors, thereby affording HSV oncolytic properties that were not naturally possessed.

As previously described, adenoviruses fail to target cancer cells specifically. Different studies have been carried out in order to circumvent this obstacle. Two examples where potentially oncolytic adenoviruses were retargeted either against the cancer cell-specific receptor Delta-EGFR [47] or $\alpha V\beta 6$ integrin, which is upregulated in numerous carcinomas [48], are described. Treatment of intracranial human glioma xenografts by Delta-EGFR-retargeted adenovirus resulted in the prolonged survival of mice, while targeting of $\alpha V\beta 6$ integrin resulted in increased uptake of oncolytic adenovirus by tumor cells and reduced hepatic toxicity.

The MV has been shown to be naturally oncolytic against a wide range of tumors. However, as the MV receptor CD46 is basally expressed on all nucleated cells, different groups are trying to improve MV tumor selectivity. Jing *et al.* have developed a measles viral strain retargeted against the urokinase receptor, which is overexpressed in multiple malignancies [49]. This virus was tested in a breast cancer xenograft model and demonstrated both specific anti-tumor effects and tumor vascular targeting. In another study, MV was engineered to target the prostate-specific membrane antigen (PSMA) molecule [50]. This study demonstrated both efficient redirection of the virus to PSMA-positive prostate cancer cells and viral oncolytic activity with regression of tumor xenografts.

Exploiting intracellular pathway aberrations

Even though specific extracellular targeting appears to be the ideal approach for viruses to exert their oncolytic activity, the abundant intracellular modifications in tumor cells also offer many alternative perspectives. Targeting intracellular components would allow bypassing the receptor targeting, a critical step due to the relatively low number of available specific receptors.

First, defectiveness of the interferon pathway is clearly one of the major mechanisms used by oncolytic viruses. As previously described, VSV

or adenoviruses are amongst several viruses that are naturally sensitive to the interferon antiviral response. For VSV, the role of the MAPK pathway has already been discussed in this paper. However, other signaling pathways are also thought to be involved in the tumor selectivity of viruses.

The ONYX-015 adenovirus has been widely studied during the last decade, succeeding in every stage of clinical trial, reaching a Phase III trial in the USA and achieving commercial authorization in China [51]. The ONYX-015 virus is a modified adenovirus lacking the *E1B55kDa* gene, thus possessing a specific tropism for some cancer cells. This specificity has been largely attributed to its capacity to replicate preferentially in p53-defective cells. Numerous clinical studies using the ONYX-015 virus have shown conclusive results, notably in trials with patients with recurrent cancers of the head and neck region, metastatic colorectal cancer or pancreatic cancer, where the virus was proven to be safe and to display anti-tumor effects in some patients [52]. However, this model has been questioned by recent investigations, which showed that the p53 defects were not the main tumor-selectivity mechanisms. The real selective mechanism would, rather, be the property of the tumor cells to efficiently export late viral RNA in the absence of E1B-55K, which is absent in the ONYX-015 adenovirus [53], thereby assuring the specific replication of the virus in tumor cells.

Promoter-driven specificity

One original method that has already been developed to exploit the signaling pathways of transformed cells is the integration of specific promoters, which restrict viral replication to cancer cells only. This type of genetic engineering is now being widely investigated, led by research on adenoviruses. Considering the large number of modified viral vectors in existence, we are unable to give a complete overview of this field. However, in order to introduce this subject, four different types of targeting can be achieved by the use of specific promoters, as selectivity can be obtained against a tissue, a tumor, a pan-cancer marker or against the cells of the tumor microenvironment [54].

As an example, some research groups are focusing on oncolytic viruses that depend on survivin promoters. Survivin is a protein found in many cancer cells, which plays a central role in the inhibition of apoptosis. The promoter of this broad-spectrum tumor marker can be

integrated into adenoviral vectors in order to control the expression of the early viral gene *E1A*. Such conditionally replicating adenoviruses demonstrated oncolytic properties *in vitro* against cancer cell lines from different origins and in a murine model of osteosarcoma [55].

▣ Arming the oncolytic viruses

Once specific targeting is effectively completed, viral agents have to exhibit an efficient lytic function in order to achieve their therapeutic goal and to be considered as truly oncolytic. Although some viruses, such as MV, naturally display killing properties, several viruses need to be artificially armed to accomplish this function.

As previously discussed, various strategies can be used. The first of these is the use of prodrug convertase transgenes integrated into the viral vectors. The most famous prodrug convertases are undoubtedly thymidine kinase and cytosine deaminase, still widely utilized in oncolytic strategies [56]. Some studies report positive therapeutic effects using viral vectors armed with such molecules [57]. The oncolytic potential of a vaccinia virus armed with a yeast cytosine deaminase has recently been demonstrated against advanced ovarian cancers in both syngenic mice and human xenograft models [58].

Proapoptotic transgenes are interesting alternatives to arm oncolytic viruses. Two recent studies carried out on adenoviruses demonstrated efficient induction of apoptosis in esophageal [59] and colorectal [60] cancer cells with TRAIL- or ST13-armed adenoviruses, respectively. TRAIL is a well-known inducer of apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways, while ST13 was proposed to be a tumor-suppressor protein owing to its down-regulation in some cancer tissues compared with normal tissues.

The third main approach, which has so far been developed to confer to oncolytic viruses the ability to kill cancer cells, is the integration of immune-activating transgenes into their genome. Such a technique aims to trigger an immune response in the tumor, so as to build up a complete anti-tumor strategy. This theme is extensively discussed in the following section.

Going beyond viral oncolysis: promotion of immunogenicity

Immunity against viruses is widely considered as a potential limitation of therapies using viral vectors. Indeed, it is often envisioned to

create an immunosuppressive environment for virotherapy strategies in order to improve the efficacy of such treatments. Specific antibodies and the activation of a cellular response would, hypothetically, strongly reduce the spread of the infection within the tumor.

Nevertheless, some evidence indicates a virtual role of the immune system in the anti-tumor effects mediated by oncolytic viruses [61]. This was reported to be the case with an oncolytic reovirus that promoted a complete activation of the different immune cells naturally involved in the host anti-tumor response [62]. In fact, while such viruses promote the death of tumor cells by an apoptotic or necrotic pathway, specific antigens may be released into the extracellular environment. These tumor antigens, coupled with danger signals associated with viral infection, could, thus, create a favorable context that would elicit a specific immune response. Since direct oncolysis by viruses is not always as efficient as intended, the involvement of the immune system could potentiate the therapeutic effects of cancer virotherapy.

Therefore, we previously demonstrated that the phagocytosis of apoptotic, measles-infected mesothelioma cells by immature human DCs induces the spontaneous maturation of these DCs, which then become capable of activating a CD8⁺ lymphocyte T-cell response that is specific to one tumor antigen, particularly mesothelin [63]. Our results demonstrate that MV, in addition to its direct oncolytic properties, is capable of initiating the implementation of a specific immune response directed against mesothelioma antigens, thus increasing the specific interest of MV as an anti-tumor agent. In this optic, we have recently found that the release of the high-mobility group box 1 (HMGB1) molecule by infected cells would play a role in the activation of an anti-tumor immune response [BOISGERAULT N, UNPUBLISHED DATA], HMGB1 having been described as essential for efficient activation of the immune system, notably of DCs, by dying cells [64].

Some studies have already taken this turn as several attempts were made to integrate 'immunogenic' genes into a variety of viral vectors. This new type of armed oncolytic virus opens up new perspectives in the multimodal management of cancer pathologies. The following text provides an overview of recent studies that have described results of interest in the field of anti-tumor immunity induced by infections with oncolytic viruses.

■ Use of cytokine transgenes

Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) is a central cytokine, well known for its role in the production and differentiation of macrophages and DCs. Since several research groups have focused on this growth factor in order to improve the anti-tumor effects of oncolytic viruses, a variety of viral vectors containing a GM-CSF transgene have already been tested.

The first example is an NDV vector that produced a biologically active and stable GM-CSF product without disturbing the replication and tumor selectivity of the virus [60]. *In vitro* assays demonstrated the production of IFN- α through the activation of monocytes and plasmacytoid DCs, indicating a cascade of immunological effects after infection.

The JX-963 strain of poxvirus, genetically engineered with a GM-CSF recombinant gene, displayed oncolytic efficacy *in vitro* against numerous human cancer cell lines and *in vivo* in immunocompetent mice, thereby raising hopeful clinical perspectives [61]. Another poxvirus strain, JX-594, has already undergone a Phase I clinical trial and showed acceptable GM-CSF production, anti-tumor efficacy and side effects, leading to a Phase II trial [62].

Some adenoviruses were also tested in this way. The replication-competent oncolytic adenovirus, TOA02, driven by a telomerase hTERT promoter, showed anti-tumor efficacy *in vitro* and *in vivo* in nude mice. GM-CSF appeared to strongly increase anti-tumor effects in immunocompetent mice through the induction of more mature DCs and macrophages [63]. The alternative adenovirus KH901 was also tested in a Phase I study on patients with recurrent head and neck cancers, showing an efficient, systemic production of GM-CSF [64].

Interleukins

Various interleukins involved in the development of an anti-tumor immune response are able to be incorporated into oncolytic viral vectors. The integration of IL-2 has been tested, for example, in an NDV vector, which was used successfully in a murine model of melanoma [70]. Infection by such engineered NDV induced the activation of a specific immune response directed against melanoma cells, through the activation of tumor-specific CTL. Moreover, a partial resistance to tumor challenge was observed.

IL-12 plays a central role in the induction of the cellular immune response expected in anti-tumor immunotherapeutic strategies. Some studies have evaluated the use of viral vectors supplemented with IL-12 transgenes. A viral vector in which such a gene was added showed a striking efficiency in an immunocompetent mouse model of head and neck squamous cell carcinoma [71]. Indeed, a reduction in tumor volume was observed and was associated with a survival benefit for the animals.

Another group used a HSV-1 virus containing either *IL-12* or *IL-18* genes [72]. Both viruses showed cytotoxic efficiency, which was strongly improved when the recombinant viruses were used in combination. Infection of athymic mice by such viruses demonstrated the importance of the T-cell response in the development of the anti-tumor effects, thereby, verifying the role of immunity in the oncolytic properties of certain viruses. Viral vectors supplemented by the *IL-18* transgene alone were also used in a study using an adenovirus [73]. The results demonstrated a strong cytopathic effect through the triggering of apoptosis of cancer cell lines, even if the anti-tumor effect may have been caused by the inhibition of angiogenesis, rather than by a direct immune response against cancer cells. However, since IL-18 is known to play an essential role in the activation of NK cells and T cells, it remains an attractive candidate for the enhancement of proimmune effects following the use of oncolytic viruses.

IL-24 belongs to the IL-10 family. Similar to IL-18, IL-24 displays alternative 'nonimmune' properties: its ability to regulate cell survival and proliferation is suggested to confer potential tumor-suppression capacities. The IL-24 transgene has been recently inserted into an adenoviral vector – Ad.sp-E1A₍₃₅₃₎ – which showed anti-tumor effects on numerous cell lines of different origin [74]. Furthermore, the growth of lung carcinoma cells was inhibited in nude mice.

Other studies relate to the use of alternative interleukin transgenes, such as IL-4 [75] or IL-15 [76], thus offering a remarkable range of possibilities to envision the utilization of such molecules in order to potentiate the anti-tumor properties of oncolytic viruses.

Type I interferons

We previously discussed the tumor specificity of oncolytic viruses due to defects in the antiviral interferon response pathway. An original work by Shashkova *et al.* relates to the use of a modified adenoviral vector mutated in its *E1A*

gene and armed with the IFN- α_2 transgene [77]. Similar to other oncolytic adenoviruses, mutation in E1A allows for specific replication in tumor cells as the E1A protein becomes unable to fix proteins involved in the IFN- α pathway and, accordingly, fails to inhibit this pathway. Hence, interferon signaling should remain efficient in noncancer cells, thus improving safety for the use of the vector. The transgenic IFN- α_2 would be an additional safety mechanism, preventing the infection of noncancer cells. Antitumor effects of the virus were observed in both nude mice and immunocompetent Syrian hamster models, but unfortunately, the implication of the immune system due to IFN- α was not discussed and, thus, remains unclear.

One study has demonstrated anti-tumor properties of an adenovirus containing the IFN- α gene in immunocompromised mice, again enhanced in immunocompetent mice [78]. Similarly, the direct cytotoxicity plus the indirect immunological antitumor activity of IFN- α were shown to inhibit the growth of human xenografts of pancreatic cancer in mice through the direct induction of tumor cell death and the activation of NK cells [79].

Other proimmune cytokines & chemokines

Additional proimmune transgenes were used in different studies in order to reach an efficient anti-tumor immune response. As an example, the chemokine RANTES, also known as CCL5, was inserted into an adenoviral vector, which was tested in murine models of lymphoma and metastatic mammary carcinoma [80]. Tumor growth, regression and blocking of metastasis formation were observed, strikingly associated with an enhanced tumor infiltration by various immune cells including DCs, macrophages, NK and CD8⁺ T cells. NK and cytotoxic T cell responses, along with enhanced secretion of IFN- γ and IL-12, were found, thereby opening interesting perspectives in the development of immunological aspects in cancer virotherapy.

■ Infection environment

Since the immune response may be considered to play an important role in the therapeutic effects of cancer virotherapy, some researchers have focused upon modifications of the tumor environment by viral infections. Not only the release of cytokines, but also the oncolytic viruses themselves, are susceptible of eliciting a specific host immune response, as do common viral infections. Along with tumor antigen

release, danger signals are intended to authorize the development of a specific anti-tumor response, in addition to the direct oncolysis of tumor cells by viruses.

Viral components, such as viral particles and nucleic acids, are undoubtedly one of the major danger signals. Indeed, viral DNA and RNA are specific ligands for Toll-like receptors (TLRs) expressed on different immune cell types, including DCs. Such 'danger' molecules are actually able to trigger a strong immune response, thereby setting up a favorable environment for activation of the immune system.

Infected tumor cells are susceptible to contribute to the triggering of these mechanisms. The role of antiviral pathways has to be considered since they are not always defective in every tumor. Moreover, many cell stress molecules have been shown to be synthesized and released during the infection process, especially after apoptosis triggering or lysis. We will discuss some of these molecules in the following section, in order to give a rapid overview of this new field.

Heat shock proteins

In one of our previous studies, we demonstrated that mesothelioma cell lines are efficiently infected by our Schwarz strain of MV, and killed by apoptosis after forming syncytia, in contrast to normal, nontransformed cells that express a basal level of CD46 and that remain only slightly sensitive, or even insensitive, to infection [81]. The infection of mesothelioma cells by the Schwarz strain of MV induced the production of immunogenic molecules within these cells. The stress protein HSP70, better known as an activating molecule of DCs [81], was demonstrated to be overexpressed in infected mesothelioma cells. It remains controversial whether HSP70 is actually able to directly activate DCs through TLR signaling, as recent work suggests that this protein only serves as a chaperone for TLR ligands without any intrinsic 'cytokine' property [82].

In addition to these proimmune characteristics and its widely described chaperone role, HSP70 was also shown to exhibit a peptide presentation function to DCs [83], thereby participating in the cross-presentation of antigens on class I MHC molecules. This property is of great interest in cancer immunotherapy as it is intended in such therapeutic protocols to develop a tumor antigen-specific immune response using cross-activated cytotoxic T cells.

Other members of the HSP family, such as HSP60, HSP90 or gp96, were shown to act as stress-related 'danger' molecules and to

participate in the immune response mechanisms [82]. Future studies should focus on these proteins in order to better characterize their potential role in cancer virotherapy.

Other immunogenic molecules

In recent years, different studies have suggested that calreticulin exposure on the surface of dying cells is a fundamental step in triggering immunogenic cell death [83]. However, a recent article reviewed the way in which numerous types of viruses have evolved mechanisms in order to subvert this immunogenic pathway and, thus, escape the host immune response [85]. Consequently, it remains undetermined how infection with oncolytic viruses is able to provoke the externalization of calreticulin and, thereby, elicit a specific immune response against tumor cells.

An increasing number of other potential immunogenic molecules have been described in the last few years. For example, the release of uric acid from dying cells was shown to play a role in alerting the immune system to cell death [86]. The HMGB1 protein is now considered as a central immunogenic molecule, since different studies confirmed its role for deciding if cell death is immunogenic or not [84]. HMGB1 effects would pass by TLR signaling in immune cells [87], as do some other immunogenic molecules [88].

Alternative approaches

Apart from the use of cytokine transgenes and immunogenic stress molecules, novel strategies are expected to improve perspectives in oncolytic virotherapy. A number of viruses and viral vectors used in gene therapy, of which some are detailed below, are known to activate the immune system. Such activation of the immune system after anti-tumor viral treatment firstly depends on the recruitment of immune cells at the tumor site. Ramakrishna *et al.* used both Ad-MIP1 α and Ad-Flt3L viruses, two adenoviruses expressing macrophage inflammatory protein 1 α (MIP1 α and CCL3) and Fms-like tyrosine kinase-3 ligand (Flt3-L), respectively [89]. The authors demonstrated an increased infiltration of DCs and T lymphocytes into the infected lung tumors in a mouse model, along with an enhanced, anti-tumor immune response. Moreover, systemic anti-tumor activity in immunocompetent mice, but not in nude mice, was observed. Another adenoviral vector expressing Flt3-L was used in combination with a HSV containing a thymidine kinase transgene in a glioblastoma multiforme mouse model [90]. Tumor elimination was shown to be dependent

on CD8 T cells and, interestingly, was associated with a systemic release of HMGB1. The authors dealt with the role for considered HMGB1 as a potential, noninvasive biomarker of therapeutic efficacy.

Since TLR activation remains a critical key point in eliciting an immune response, a parvovirus H-1PV strain was engineered to exhibit CpG motifs [91] in its genome. Such modification promoted enhanced activation of TLR9, thereby triggering an overexpression of CD80 and CD86 and increased secretion of IFN- γ by DCs in the lymph nodes. An associated 50% decrease in hepatoma lung metastases was also obtained in a rat model. Another study demonstrated that an adenovirus expressing β -defensin-2 was able to induce attraction of mature plasmacytoid DCs to the tumor site, in addition to the direct oncolytic effects of the adenovirus against primary breast cancer cells *in situ* [92]. The plasmacytoid DC recruitment resulted in a specific, anti-tumor immunity in mice.

CD40 ligand (CD40-L) is a well-known pro-immune molecule. It plays an essential function in DC-T cell cross-talk, but is also described as exhibiting pro-apoptotic activities. Recently, adenoviruses expressing CD40-L were tested against different tumor types. An Ad-CD40-L was shown to induce apoptosis of mouse prostate adenocarcinoma cells *in vitro* [93]. Injection of these infected cells into mice promoted an anti-tumor immunity, while subsequent peritumoral injections of Ad-CD40-L were associated with suppression of tumor growth. Another group recently demonstrated oncolytic properties of a different Ad-CD40-L against multiple myeloma, along with induction of apoptosis after S-phase blockade, and upregulation of TRAIL, Fas and IL-8 proapoptotic molecules [94]. This resulted in a reduction of tumor growth, showing that growth-inhibitory activity of CD40-L can act together with its proimmune activity. A previous study by the same team, carried out on breast cancer, demonstrated comparable results [95].

Regulatory T cells (Tregs) are implicated in tumor immune evasion strategies. Cyclophosphamide (CPA) can enhance the transient depletion of Tregs and, thus, improve anti-tumor immunity. CPA treatment along with IL-2 and reovirus induced an efficient, anti-tumor response in a melanoma mouse model [96]. Interestingly, CPA induced less toxicity than previous anti-Treg treatments. Such results allow the authors to envision using higher doses of reovirus in future clinical trials. CPA was also shown to potentiate the oncolytic effects of an

adenovirus engineered to produce the secreted stress protein, gp96 [97]. This viral vector was actually able to induce an anti-tumor response in a mouse model, although these properties were previously limited by the intervention of Tregs. Thus, CPA was used in order to enhance virus-related, anti-tumor effects. In another model, where a TRAIL-expressing adenovirus was used [97], slight suppression of Tregs by low doses of CPA was shown to promote oncolytic effects that were not observed in the absence of CPA treatment.

■ Evasion from the immune system

As previously mentioned, some findings indicate a role for the immune system in the impairment of cancer virotherapy. Although this role remains unclear, different approaches have been developed to evade antiviral immune responses.

We have discussed the use of CPA at low doses in some studies in order to eliminate Tregs from the tumor environment. However, CPA is also often used as an immunosuppressive drug, which is able to broadly impair immune responses. For example, CPA was shown to improve oncolytic efficacy of both reovirus [98] and adenovirus [99] in immunocompetent mouse and Syrian hamster models, respectively, by suppressing antiviral immune responses. In the study on reovirus, moderate doses of CPA induced only a reduction of neutralizing antibodies levels, thereby promoting a safety mechanism by which high viral replication levels from tumor cells were controlled and only caused reduced toxicity. Moreover, CPA was demonstrated to enhance glioma therapy using HSV [100]. CPA plus HSV treatment resulted in the inhibition of innate immune responses, implying infiltration of brain macrophages and production of IFN- γ by NK cells in the tumor.

Cell carriers are another alternative strategy to hide oncolytic viruses from the host immune system. This approach consists of loading viruses into or onto viable cells to allow viruses to freely circulate in the organism, for example, after systemic delivery. Different studies have already reported the efficient use of cell carriers *in vivo*. For example, MV was tested for delivery by mesenchymal stem cells in an ovarian cancer model [101] or by DCs in a breast cancer model [102]. These studies demonstrate the escape of viruses from the antibody antiviral response and the efficient achievement of oncolytic activity. DCs and T cells were also used as cell carriers for reovirus against melanoma in an immunocompetent mouse model [103]. In

this study, the authors reported that T cells and mature DCs were effectively able to carry loads of viruses to the tumor and to subsequently elicit priming of an anti-tumor immune response. For an extensive overview of cell carriers, refer to the elegant review by Willmon *et al.* [104].

■ Activation versus inhibition of the immune system

The role of the immune system in the efficacy or the failure of cancer virotherapy needs, undoubtedly, to be better understood. Indeed, some findings point to a negative role of the immune system due to the ability of antibodies or some phagocytic cells to dramatically reduce viral loads, and thereby impair the anti-tumor effects of oncolytic viruses. Conversely, it appears undeniable that the immune system can act synergistically with such viruses, as many studies have reported better anti-tumor responses following oncolytic virus injection into immunocompetent animals. Different reports suggest that this dichotomy cannot be considered as a common opposition between innate and adaptive immune responses. This major question should be resolved in order to improve cancer virotherapy clinical trials in the next few years. The future success of cancer virotherapy treatments relies partially on advances in this field of research. Prestwich *et al.* focused on this 'Judgement of Solomon' in an excellent review [105].

Conclusion

Oncolytic viruses must present three principal characteristics. First, they must obviously be capable of specifically targeting tumor cells, whereas healthy cells should remain more resistant to infection. Second, these viruses must possess a lytic function, either naturally or acquired by the insertion of a toxic gene, such that infected tumor cells can be destroyed and in the long term the tumor will be eradicated. Third, the use of these viruses in a therapeutic context requires that their safety can be guaranteed by the choice of genetically stable viruses and by improving the specificity of the virus for tumor cells. In addition to these basic characteristics, several studies suggest that an 'ideal' oncolytic virus must also be capable of favoring the induction of an immune response specifically directed against tumor cells [41]. Indeed, it is now widely considered that many different molecules, some of which are previously described, are able to turn 'classic' cell death into an immunogenic process. Direct lysis by oncolytic viruses associated with the proimmune activities of such



molecules would bring a potential, complete anti-tumor response. Moreover, the immunogenic cell death may allow a better efficacy of cancer virotherapy treatments in the short term, but also in the long term by the installation of an immune memory against tumor antigens.

Several points have to be optimized to best define the position that virotherapy will occupy in the future in the battle against cancers. The major challenge remains to secure the use of oncolytic viruses; the viruses that naturally demonstrate these capacities are at the forefront of anti-tumor virotherapy development. Advances in knowledge regarding recombinant viral vectors are allowing new perspectives to be envisaged in the short term in order to better respond to the diversity of cancerous pathologies.

Trial protocols with treatments using viruses in combination with either radiotherapy or chemotherapy have shown that irradiation [106], or certain molecules [107], improve the anti-tumor activity of oncolytic viruses in different tumor models. A recent review by Nguyen *et al.* focused on the RNA oncolytic viruses used in such combined therapeutic strategies [108], raising additional arguments for the use of virotherapy in combination with 'conventional' treatments of cancer.

Cancer virotherapy appears to be a hopeful, emerging field that offers a wide range of possibilities to partially replace, or to complete,

conventional anticancer therapeutic strategies. A best management strategy for the treatment of cancerous pathologies may be expected, following from the significant advances, which can be expected in the coming years, bringing an exciting outlook to this field of investigation.

Future perspective

The currently known oncolytic viruses offer a multitude of possibilities to respond to the diversity of cancerous pathologies. However, future improvements are awaited. Tumor specificity and killing capacities are constant issues pertinent to all anticancer treatments, but alternative possibilities can be envisioned for the future. Many recent studies have described the use of oncolytic viruses in combined therapeutic protocols, either with chemotherapy or radiotherapy. Interesting results have been observed and therapeutic advances are expected within the next 5 years. These strategies could become of central interest for anticancer therapy, since a combination of different approaches for cancer treatment is now widely accepted as a significant perspective.

Involvement of the immune system should also be considered as an important aspect of cancer virotherapy. Recent results obtained in studies of newly discovered immunogenic molecules allow us to envision rapid advances in this direction. This could participate to

Executive summary

Major oncolytic viruses

- Many different RNA viruses naturally exhibit oncolytic properties, as they are able to harness antiviral mechanistic deficiencies and, thus, to display a preferential tropism for transformed cancer cells.
- Newcastle disease virus, vesicular stomatitis virus, measles virus and reovirus are among the most studied oncolytic RNA viruses, owing to their anti-tumor activities demonstrated both against miscellaneous human cancer cell lines *in vitro* and in mouse models *in vivo*.
- DNA viruses rarely demonstrate natural oncolytic properties but are good candidates for genetic engineering in order to achieve such capabilities.

Improvements of the oncolytic properties

- Improved specificity for tumor cells can be achieved by different strategies including receptor targeting, exploitation of intracellular aberrations or the use of promoter-driven viruses.
- In order to develop oncolytic viruses, which are truly able to eliminate tumor-infected cells, such viruses can be armed with prodrug convertases or proapoptotic transgenes.

Going beyond viral oncolysis: promotion of immunogenicity

- Cytokine transgenes (e.g., granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukins, interferons and chemokines) provide for oncolytic viruses the capacity to elicit an anti-tumor immune response, in addition to direct viral oncolytic effects.
- The proimmune environment created in part by the release of immunogenic molecules, such as heat shock proteins or HMGB1, participates in the immune effects of oncolytic viruses.
- The role of the immune system in favor or against cancer virotherapy efficacy has to be addressed.

Conclusion

- In addition to the already known properties of oncolytic viruses (specificity, cell death and safe use), their proimmune capacities could also play an important role in their anticancer therapeutic efficacy.
- Combined treatments using oncolytic viruses together with chemotherapies or radiotherapies represent interesting possibilities for new treatment modalities; as they would permit a better, more tailored response to the multiplicity of cancerous pathologies.

advances in cancer immunotherapy, since this strategy failed to obtain striking therapeutic results to date.

During the next decade, particular attention will be paid to clinical trials in which oncolytic viruses are used. Indeed, critical results are expected to the exciting current theories to lead to real therapeutic advances.

Acknowledgements

The authors extend special thanks to Katherine Krain and Kate Vautour for editing the manuscript.

Financial & competing interests disclosure

This work was supported by l'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and La Ligue Intérrégionale contre le Cancer (Grand Ouest). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as:

* of interest

** of considerable interest

- Hantz E, Quick J, Libutti SK: The tumour microenvironment: a novel target for cancer therapy. *Oral Dis.* 15(1), 8–17 (2009).
- Schuster M, Nezhansky A, Kirchis R: Cancer immunotherapy. *Biochemol. J.* 1(2), 13B–147 (2006).
- Birman HR, Hammon WM, Eddie BU, Meyer KF, Shimkin MB: The effect of virus and bacterial infections on neoplastic diseases. *Cancer Res.* 10(4), 203–204 (1950).
- Chinoco EA: Oncolytic viruses. *Nat. Rev. Cancer* 2(12), 938–950 (2002).
- Russell SJ: RNA viruses as virotherapy agents. *Cancer Gene Ther.* 9(12), 961–966 (2002).
- Lonore RM, Kanahig BB, Reichard KW *et al.*: Complete regression of human fibrosarcoma xenografts after local Newcastle disease virus therapy. *Cancer Res.* 54(23), 6017–6021 (1994).
- Phuangsub A, Lonore RM, Reichard KW, Peoples ME, Walter RJ: Newcastle disease virus therapy of human tumor xenografts: antitumor effects of local or systemic administration. *Cancer Lett.* 172(1), 27–36 (2001).
- Elankumaran S, Rockemann D, Samal SK: Newcastle disease virus exerts oncolysis by both intrinsic and extrinsic caspase-dependent pathways of cell death. *J. Virol.* 80(15), 7522–7534 (2006).
- Lonore RM, Roberts MS, O'Neil JD *et al.*: Phase I clinical experience using intravenous administration of PV701, an oncolytic Newcastle disease virus. *Curr. Cancer Drug Targets* 7(2), 157–167 (2007).
- Laurie SA, Bell JC, Atkins HL *et al.*: A Phase I clinical study of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, using two-step desensitization. *Clin. Cancer Res.* 12(8), 2555–2562 (2006).
- Horie SJ, Lorence RM, Hirst HW *et al.*: An optimized clinical regimen for the oncolytic virus PV701. *Clin. Cancer Res.* 13(3), 977–985 (2007).
- Freeman AI, Zakay-Rones Z, Gomori JM *et al.*: Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. *Mol. Ther.* 13(1), 221–228 (2006).
- Yacov B, Elishoo E, Lazar I *et al.*: Selective oncolytic effect of an attenuated Newcastle disease virus (NDV-HUJ) in lung tumours. *Cancer Gene Ther.* 15(12), 795–807 (2008).
- Barber GN: Vesicular stomatitis virus as an oncolytic vector. *Viral Immunol.* 17(4), 516–527 (2004).
- Lichty BD, Power AT, Sostitt DF, Bell JC: Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. *Trends Mol. Med.* 10(5), 210–216 (2004).
- Novot JA, Muel AA, Sakuma R *et al.*: The RAS/Raf1/MEK/ERK signaling pathway facilitates VSV-mediated oncolysis: implication for the defective interferon response in cancer cells. *Mol. Ther.* 15(8), 1531–1536 (2007).
- Balachandran S, Potosnicu M, Barber GN: Oncolytic activity of vesicular stomatitis virus is effective against tumors exhibiting aberrant p53, Rac, or myc function and involves the induction of apoptosis. *J. Virol.* 75(7), 3474–3479 (2001).
- Ordovan K, Wolfmann G, Piepmeyer JM, van den Pol AN: Systemic vesicular stomatitis virus selectively destroys multifocal glioma and metastatic carcinoma in brain. *J. Neurosci.* 28(8), 1882–1893 (2008).
- Shi W, Tang Q, Chen X *et al.*: Antitumor and antimetastatic activities of vesicular stomatitis virus matrix protein in a murine model of breast cancer. *J. Mol. Med.* 87(5), 493–506 (2009).
- Dhiman N, Jacobson RM, Poland GA: Measles virus receptors: SLAM and CD46. *Rev. Med. Virol.* 14(4), 217–229 (2004).
- Garca D, Fishelson Z: Cancer resistance to complement-dependent cytotoxicity (CDC): problem-oriented research and development. *Mol. Immunol.* 46(14), 2794–2800 (2009).
- Anderson RD, Nakamura T, Russell SJ, Fong KW: High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus. *Cancer Res.* 64(14), 4919–4926 (2004).
- Blechacz B, Russell SJ: Measles virus as an oncolytic vector platform. *Curr. Gene Ther.* 8(3), 162–175 (2008).
- Heinzeling L, Kunzi V, Oberholzer PA, Kundig T, Naim H, Dummer R: Oncolytic measles virus in cutaneous T-cell lymphomas mounts antitumor immune responses *in vivo* and targets interferon-resistant tumor cells. *Blood* 106(7), 2287–2294 (2005).
- Mundschau LJ, Fuller DV: Endogenous inhibitors of the dsRNA-dependent eIF-2 alpha protein kinase PKR in normal and ras-transformed cells. *Biochimie* 76(8), 792–800 (1994).
- Norman KL, Coffey MC, Hirasawa K *et al.*: Reovirus oncolysis of human breast cancer. *Hum. Gene Ther.* 13(5), 641–652 (2002).
- Alain T, Hirasawa K, Pon KJ *et al.*: Reovirus therapy of lymphoid malignancies. *Blood* 100(12), 4146–4153 (2002).
- Hirasawa K, Nishikawa SG, Norman KL, Alain T, Koszalkowska A, Lee FW: Oncolytic reovirus against ovarian and colon cancer. *Cancer Res.* 62(6), 1696–1701 (2002).
- Marcato P, Dean CA, Giacomantonio CA, Lee FW: Oncolytic reovirus effectively targets breast cancer stem cells. *Mol. Ther.* 17(6), 972–979 (2009).
- Pandha HS, Heinemann L, Simpson GR *et al.*: Synergistic effects of oncolytic reovirus and cisplatin chemotherapy in murine malignant melanoma. *Clin. Cancer Res.* 15(19), 6158–6166 (2009).

31. Sei S, Murois JK, Yang QE *et al.*: Synergistic antitumor activity of oncolytic reovirus and chemotherapeutic agents in non-small cell lung cancer cells. *Mol. Cancer* 8, 47 (2009).
32. Vidal L, Pandha HS, Yap TA *et al.*: A Phase I study of intravenous oncolytic reovirus type 3 Dearing in patients with advanced cancer. *Clin. Cancer Res.* 14(21), 7127–7137 (2008).
33. Gollamudi R, Ghalib MH, Desai KK *et al.*: Intravenous administration of Reolysin®, a live replication competent RNA virus is safe in patients with advanced solid tumors. *Invest. New Drugs* DOI: 10.1007/s10637-009-9279-8 (2009) (Epub ahead of print).
34. Prosswirth RJ, Ileri EJ, Errington F *et al.*: Immune-mediated antitumor activity of reovirus is required for therapy and is independent of direct viral oncolysis and replication. *Clin. Cancer Res.* 15(13), 4374–4381 (2009).
35. Myers R, Grainer S, Harvey M *et al.*: Oncolytic activities of approved mumps and measles vaccines for therapy of ovarian cancer. *Cancer Gene Ther.* 12(7), 593–599 (2005).
36. Toyoda H, Yin J, Mueller S, Wimmer E, Cerlo J: Oncolytic treatment and cure of neuroblastoma by a novel attenuated poliovirus in a novel poliovirus-susceptible animal model. *Cancer Res.* 67(6), 2857–2864 (2007).
37. Angelova AL, Apeahamian M, Balboni G *et al.*: Oncolytic rat parvovirus H-1PV, a candidate for the treatment of human lymphoma: *in vivo* and *in vitro* studies. *Mol. Ther.* 17(7), 1164–1172 (2009).
38. Nawa A, Lun C, Zhang L *et al.*: Non-engineered, naturally oncolytic herpes simplex virus HSV1 HF-10: applications for cancer gene therapy. *Curr. Gene Ther.* 8(3), 208–221 (2008).
39. Kimata H, Inai T, Kikumori T *et al.*: Pilot study of oncolytic viral therapy using mutant herpes simplex virus (HF10) against recurrent metastatic breast cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 13(8), 1078–1084 (2006).
40. Fujimoto Y, Mizuno T, Sugitani S *et al.*: Intratumoral injection of herpes simplex virus HF10 in recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol.* 126(10), 1115–1117 (2006).
41. Fielding AK: Measles as a potential oncolytic virus. *Rev. Med. Virol.* 15(2), 135–142 (2005).
- * The author enumerates the principal properties that should be displayed by an 'ideal' oncolytic virus.
42. Thorne SH, Hwang TH, Kira DH: Vaccinia virus and oncolytic virotherapy of cancer. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 7(4), 359–365 (2005).
43. Lin E, Nemanaitis J: Oncolytic viral therapies. *Cancer Gene Ther.* 11(10), 643–664 (2004).
44. Kanerva A, Hemminki A: Modified adenoviruses for cancer gene therapy. *Int. J. Cancer* 110(4), 475–480 (2004).
45. Washlet R, Russell SJ, Casel DT: Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* 8(8), 573–587 (2007).
46. Menotti L, Nicotri G, Gatta V *et al.*: Inhibition of human tumor growth in mice by an oncolytic herpes simplex virus designed to target solely HER-2-positive cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106(22), 9039–9044 (2009).
47. Piao Y, Jiang H, Alemany R *et al.*: Oncolytic adenovirus retargeted to Delta-EGFR induces selective antiangioma activity. *Cancer Gene Ther.* 16(3), 256–265 (2009).
48. Coughlin L, Vallath S, Saha A *et al.*: *In vivo* retargeting of adenovirus type 5 to $\alpha\beta$ integrin results in reduced hepatotoxicity and improved tumor uptake following systemic delivery. *J. Virol.* 83(13), 6436–6428 (2009).
49. Jing Y, Teng C, Zhang J *et al.*: Tumor and vascular targeting of a novel oncolytic measles virus retargeted against the urokinase receptor. *Cancer Res.* 69(4), 1459–1468 (2009).
50. Liu C, Hanegawa K, Russell SJ, Suddain M, Peng KW: Prostate-specific membrane antigen retargeted measles virotherapy for the treatment of prostate cancer. *Prostate* 69(10), 1128–1141 (2009).
51. Ciompton AM, Kira DH: From ONYX-015 to armed vaccinia viruses: the education and evolution of oncolytic virus development. *Curr. Cancer Drug Targets* 7(2), 133–139 (2007).
52. Wiman KG: Strategies for therapeutic targeting of the p53 pathway in cancer. *Cell Death Differ.* 13(6), 921–926 (2006).
53. O'Shea CC, Johnson L, Bagoo B *et al.*: Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity. *Cancer Cell* 6(6), 611–623 (2004).
54. Nentelbeck DM: Cellular genetic tools to control oncolytic adenoviruses for virotherapy of cancer. *J. Mol. Med.* 86(4), 363–377 (2008).
- * This exhaustive article deals with the viral genetic modifications that can be made on the viruses that are not naturally oncolytic.
55. Kamizono J, Nagano S, Muraishi Y *et al.*: Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus exhibits cancer-specific and efficient viral replication. *Cancer Res.* 65(12), 5284–5291 (2005).
56. Schepelmann S, Springer CJ: Viral vectors for gene-directed enzyme prodrug therapy. *Curr. Gene Ther.* 6(6), 647–670 (2006).
57. Guffey MB, Parker JN, Luckett WS Jr *et al.*: Engineered herpes simplex virus expressing bacterial cytosine deaminase for experimental therapy of brain tumors. *Cancer Gene Ther.* 14(1), 45–56 (2007).
58. Chalukonda S, Kivlen MH, O'Malley ME *et al.*: Oncolytic virotherapy for ovarian carcinomatosis using a replication-selective vaccinia virus armed with a yeast cytosine deaminase gene. *Cancer Gene Ther.* 15(2), 115–125 (2008).
59. Zhang X, Komaki R, Wang L, Fang B, Chang JY: Treatment of radioresistant stem-like esophageal cancer cells by an apoptotic gene-armed, telomerase-specific oncolytic adenovirus. *Clin. Cancer Res.* 14(9), 2813–2823 (2008).
60. Yang M, Cao X, Yu MC *et al.*: Potent antitumor efficacy of ST13 for colorectal cancer mediated by oncolytic adenovirus via mitochondrial apoptotic cell death. *Hum. Gene Ther.* 19(4), 343–353 (2008).
61. Prosswirth RJ, Harrington KJ, Pandha HS, Vile RG, Mekher AA, Errington F: Oncolytic viruses: a novel form of immunotherapy. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 8(10), 1581–1588 (2008).
62. Errington F, Steele L, Prosswirth R *et al.*: Reovirus activates human dendritic cells to promote innate antitumor immunity. *J. Immunol.* 180(9), 6018–6026 (2008).
63. Gauvreau A, Brandler S, Sapede-Perez C, Boisgerault N, Tangy F, Grepion M: Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response. *Cancer Res.* 68(12), 4882–4892 (2008).
64. Bianchi ME, Manfredi AA: High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol. Rev.* 220(1), 35–46 (2007).
65. Janke M, Peters B, de Leeuw O *et al.*: Recombinant Newcastle disease virus (NDV) with inserted gene coding for GM-CSF as a new vector for cancer immunogene therapy. *Gene Ther.* 14(23), 1639–1649 (2007).
66. Thorne SH, Hwang TH, O'Gorman WE *et al.*: Rational strain selection and engineering creates a broad-spectrum, systemically effective oncolytic poxvirus, JX-963. *J. Clin. Invest.* 117(11), 3350–3358 (2007).
67. Park BH, Hwang T, Liu TC *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.* 9(6), 533–542 (2008).

- 68 Lei N, Shen FB, Chang JH *et al.*: An oncolytic adenovirus expressing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor shows improved specificity and efficacy for treating human solid tumors. *Cancer Gene Ther.* 16(1), 33–43 (2009).
- 69 Chang J, Zhao X, Wu X *et al.*: A Phase I study of KH901, a conditionally replicating granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: armed oncolytic adenovirus for the treatment of head and neck cancers. *Cancer Biol. Ther.* 8(8), 676–682 (2009).
- 70 Zamarin D, Vigliani A, Kelly K, Garcia-Sastre A, Fong Y: Genetically engineered Newcastle disease virus for malignant melanoma therapy. *Gene Ther.* 16(6), 796–804 (2009).
- 71 Shin EJ, Wanna GB, Choi B *et al.*: Interleukin-12 expression enhances vesicular stomatitis virus oncolytic therapy in murine squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 117(2), 210–214 (2007).
- 72 Ito Y, Sasaki Y, Fukuhara H, Tada T: Triple combination of oncolytic herpes simplex virus-1 vectors armed with interleukin-12, interleukin-18, or soluble B7-1 results in enhanced antitumor efficacy. *Clin. Cancer Res.* 12(12), 643–652 (2006).
- 73 Zheng JN, Pui DH, Mao LJ *et al.*: Oncolytic adenovirus expressing interleukin-18 induces significant antitumor effects against melanoma in mice through inhibition of angiogenesis. *Cancer Gene Ther.* 17(1), 28–36 (2009).
- 74 Zhang KJ, Wang YG, Cao X *et al.*: Potent antitumor effect of interleukin-24 gene in the survivin promoter and retinoblastoma double-regulated oncolytic adenovirus. *Hum. Gene Ther.* 20(8), 818–830 (2009).
- 75 Post DE, Sandberg EM, Kyle MM *et al.*: Targeted cancer gene therapy using a hypoxia-inducible factor dependent oncolytic adenovirus armed with interleukin-4. *Cancer Res.* 67(14), 6872–6881 (2007).
- 76 Liu J, Wennier S, Reinhard M, Roy E, MacNeill A, McFadden G: Myxoma virus expressing interleukin-15 fails to cause lethal myxomatosis in European rabbits. *J. Virol.* 83(11), 5933–5938 (2009).
- 77 Shashkova EV, Spencer JF, Wold WS, Duronin K: Targeting interferon-alpha increases antitumor efficacy and reduces hepatotoxicity of E1A-mutated spread-enhanced oncolytic adenovirus. *Mol. Ther.* 15(3), 598–607 (2007).
- 78 Brito E, Atencio I, Helmich BK, Manéval D, Lafair D: Adenovirus delivery provides extended interferon-alpha exposure and augments treatment of metastatic carcinoma. *Cancer Gene Ther.* 13(7), 664–675 (2006).
- 79 Ohashi M, Yoshida K, Kusuda M *et al.*: Adenovirus-mediated interferon alpha gene transfer induces regional direct cytotoxicity and possible systemic immunity against pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* 93(4), 441–449 (2005).
- 80 Lapteva N, Aldrich M, Wikberg D *et al.*: Targeting the intratumoral dendritic cells by the oncolytic adenoviral vaccine expressing RANTES elicits potent antitumor immunity. *J. Immunother.* 32(2), 145–156 (2009).
- 81 Chen T, Guo J, Han C, Yang M, Cao X: Heat shock protein 70, released from heat-stressed tumor cells, initiates antitumor immunity by inducing tumor cell chemokine production and activating dendritic cells via TLR4 pathway. *J. Immunol.* 182(3), 1449–1459 (2009).
- 82 Tian MF, Gao B: Heat shock proteins and immune system. *J. Leukoc. Biol.* 85(6), 905–910 (2009).
- 83 Bendt H, Ruhlmann SC, Pandya MJ *et al.*: Human heat shock protein 70 enhances tumor antigen presentation through complex formation and intracellular antigen delivery without innate immune signaling. *J. Biol. Chem.* 282(43), 31688–31702 (2007).
- 84 Obaid M, Tevniere A, Ghiringhelli F *et al.*: Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* 13(1), 54–61 (2007).
- Role of calreticulin in the immunogenic cell death process had first been demonstrated.
- 85 Kopp O, Senovilla L, Galluzzi L *et al.*: Viral subversion of immunogenic cell death. *Cell Cycle* 8(16), 860–869 (2009).
- 86 Shi Y, Evans JE, Rock KL: Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 425(6957), 516–521 (2003).
- 87 Yu M, Wang H, Ding A *et al.*: HMGB1 signals through Toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock* 26(2), 174–179 (2006).
- 88 Chen K, Hwang J, Gong W, Iribarren P, Dunlop NM, Wang JM: Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer. *Int. Immunopharmacol.* 7(10), 1271–1285 (2007).
- 89 Ramakrishna E, Woller N, Manda B *et al.*: Antitumoral immune response by recruitment and expansion of dendritic cells in tumors infected with telomerase-dependent oncolytic viruses. *Cancer Res.* 69(4), 1448–1458 (2009).
- 90 Ghulam Muhammad AK, Candelis M, King GD *et al.*: Antriglycans immunological memory in response to conditional cytotoxic/immune-stimulatory gene therapy: humoral and cellular immunity lead to tumor regression. *Clin. Cancer Res.* 15(19), 6113–6127 (2009).
- 91 Raykov Z, Guekova S, Leuchs B, Arahamian M, Rommelaere J: Arming parvoviruses with CpG motifs to improve their oncosuppressive capacity. *Int. J. Cancer* 122(12), 2880–2884 (2008).
- 92 Lapteva N, Aldrich M, Rollins L *et al.*: Attraction and activation of dendritic cells at the site of tumor elicits potent antitumor immunity. *Mol. Ther.* 17(9), 1626–1636 (2009).
- 93 Drajic H, Leskog A, Totterman TH, Essand M: Adenovirus-mediated CD40 ligand therapy induces tumor cell apoptosis and systemic immunity in the TRAMP-C2 mouse prostate cancer model. *Prostate* 66(8), 831–838 (2006).
- 94 Fernandes MS, Gomes EM, Buncher LD *et al.*: Growth inhibition of human multiple myeloma cells by an oncolytic adenovirus carrying the CD40 ligand transgene. *Clin. Cancer Res.* 15(15), 4847–4856 (2009).
- 95 Gomes EM, Rodrigues MS, Phadke AP *et al.*: Antitumor activity of an oncolytic adenoviral-CD40 ligand (CD154) transgene construct in human breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 15(4), 1317–1325 (2009).
- 96 Kottke T, Thompson J, Diaz RM *et al.*: Improved systemic delivery of oncolytic reovirus to established tumors using preconditioning with cyclophosphamide-mediated Treg modulation and interleukin-2. *Clin. Cancer Res.* 15(2), 561–569 (2009).
- 97 Di Paolo NC, Tave S, Ni S, Hellstrom KE, Hellstrom I, Lieber A: Effect of adenovirus-mediated heat shock protein expression and oncolysis in combination with low-dose cyclophosphamide treatment on antitumor immune responses. *Cancer Res.* 66(2), 960–969 (2006).
- 98 Qiao J, Wang H, Kottke T *et al.*: Cyclophosphamide facilitates antitumor efficacy against subcutaneous tumors following intravenous delivery of reovirus. *Clin. Cancer Res.* 14(1), 259–269 (2008).
- 99 Thomas MA, Spencek JF, Toth K, Sagartz JE, Phillips NJ, Wold WS: Immunosuppression enhances oncolytic adenovirus replication and antitumor efficacy in the Syrian hamster model. *Mol. Ther.* 16(10), 1665–1673 (2008).
- 100 Fulci G, Breymann L, Gianni D *et al.*: Cyclophosphamide enhances glioma virotherapy by inhibiting innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(34), 12873–12878 (2006).
- 101 Mader EK, Maeyama Y, Lin Y *et al.*: Mesenchymal stem cell carriers protect oncolytic measles virus from antibody neutralization in an orthotopic ovarian cancer therapy model. *Clin. Cancer Res.* 15(23), 7246–7255 (2009).

- 102 Iankov ID, Maaubel P, Allen C *et al.*: Demonstration of anti-tumor activity of oncolytic measles virus strains in a malignant pleural effusion breast cancer model. *Breast Cancer Res Treat*. DOI: 10.1007/s10549-009-0602-z (2009) (Epub ahead of print).
- 103 Hett EJ, Prestwich RJ, Kotrka T *et al.*: Dendritic cells and T cells deliver oncolytic reovirus for tumour killing despite pre-existing anti-viral immunity. *Gene Ther*. 16(5), 689-699 (2009).
- 104 Willmon C, Harrington K, Kotrka T, Prestwich R, Melcher A, Vile R: Cell carriers for oncolytic viruses: Fed Ex for cancer therapy. *Mol. Ther.* 17(10), 1667-1676 (2009).
- 105 Prestwich RJ, Errington F, Diaz RM *et al.*: The case of oncolytic viruses versus the immune system: waiting on the judgment of Solomon. *Hum. Gene Ther.* 20(10), 1119-1132 (2009).
- 106 Focuses on the opposition between the potential benefits and drawbacks of the immune system in the field of cancer virotherapy.
- 107 Post DE, Fulci G, Chiocca EA, Van Meir EG: Replicative oncolytic herpes simplex viruses in combination cancer therapies. *Curr. Gene Ther.* 4(1), 41-51 (2004).
- 108 Kumar S, Gao L, Yeagy B, Reid T: Virus combinations and chemotherapy for the treatment of human cancers. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 10(4), 371-379 (2008).
- 109 Nguyen TL, Tamilasci VF, Singhroy D, Arguella M, Hiscott J: The emergence of combinatorial strategies in the development of RNA oncolytic virus therapies. *Cell Microbiol.* 11(6), 889-897 (2009).
- 110 Recent advances in combined anticancer strategies using RNA oncolytic viruses.

■ Websites

- 201 Mayo Clinic: clinical trials
<http://clinicaltrials.mayo.edu>
- 202 Oncolytics Biotech Inc.: clinical trials
www.oncolyticsbiotech.com/clinical.html

Utilisation du virus de la rougeole en virothérapie anti-tumorale

Malgré des améliorations constantes, les thérapies anti-tumorales conventionnelles (chirurgie, chimiothérapie ou radiothérapie) demeurent parfois inefficaces. La virothérapie anti-tumorale apparaît comme une stratégie thérapeutique alternative. Elle repose sur les propriétés de certains virus qui présentent naturellement ou après modification la capacité de cibler les cellules tumorales sans affecter les cellules saines. La souche vaccinale du virus de la rougeole (MV) présente ainsi de façon naturelle de telles propriétés oncolytiques contre plusieurs cancers grâce au ciblage de la molécule CD46, surexprimée par certaines cellules tumorales. J'ai ainsi montré que le virus MV pouvait cibler de façon spécifique des cellules de mésothéliome *in vitro* et de mélanome, d'adénocarcinomes pulmonaires et colorectaux *in vitro* et *in vivo*. L'infection de ces cellules par le virus MV provoque leur mort dans un contexte immunogène permettant le développement d'une réponse immunitaire via la maturation des cellules dendritiques et l'activation de lymphocytes T. L'immunogénicité de la mort cellulaire dépend de la production et de la libération de molécules de danger. J'ai notamment montré que le virus MV induisait la production de la protéine Hsp70, la translocation de calréticuline vers la surface cellulaire et la libération de HMGB-1 dans le milieu extracellulaire par les cellules tumorales infectées. L'implication du système immunitaire permettrait notamment d'améliorer l'activité oncolytique directe du virus MV. Ces résultats apportent de nouveaux arguments pour l'utilisation du virus MV dans le cadre de traitements anti-tumoraux contre les cancers résistants aux thérapies actuelles.

Mots-clés : cancer – virus de la rougeole – virothérapie – cellule dendritique – mort cellulaire immunogène – Hsp70 – HMGB-1

Use of measles virus in cancer virotherapy

Despite continuous advances, conventional anti-tumour therapies (surgery, chemotherapy, radiotherapy) remain partly ineffective. Thus, cancer virotherapy appears as a potential therapeutic alternative. Some viruses exhibit, either naturally or after genetic engineering, the ability of targeting specifically tumour cells without infecting the healthy ones. Vaccinal strain of measles virus (MV) naturally displays such oncolytic properties against a wide range of cancers due to targeting of CD46 receptor that is overexpressed by some cancer cells. I demonstrated that oncolytic MV specifically targets mesothelioma cells *in vitro* and melanoma, lung and colorectal adenocarcinoma cells both *in vitro* and *in vivo*. Infection of these tumour cells by MV induces cell death in an immunogenic way and thus allows an immune response to develop by maturing dendritic cells and activating T lymphocytes. Cell death immunogenicity depends on production and release of danger molecules by dying cells. I showed that MV infection induces Hsp70 production, calreticulin translocation to cell surface and release of HMGB-1 into extracellular medium by infected tumour cells. Involvement of the immune system would improve the direct oncolytic properties of MV. Altogether, these results give new arguments for the use of MV as anti-tumour therapeutics against resistant cancers.

Keywords: cancer – measles virus – virotherapy – dendritic cell – immunogenic cell death – Hsp70 – HMGB-1