

THESE DE DOCTORAT

DE L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : Biologie des organismes

Par **Tiphaine DELAUNAY**

Étude de différents virus oncolytiques pour l'immunothérapie
du cancer : Mécanismes de la sensibilité tumorale
et effets sur la réponse immunitaire.

Thèse présentée et soutenue à « Nantes », le 05 Octobre 2018

Unité de recherche : INSERM U1232, CRCINA, Nantes

Thèse N° :

Rapporteurs avant soutenance :

Gilles UZE	Directeur de Recherche, Université Montpellier II Sciences et Techniques
Branka HORVAT	Directrice de Recherche, Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon

Composition du Jury :

Président :	Pierre CORDELIER	Directeur de Recherche, Centre de Recherche en Cancérologie, Toulouse
Examineurs :	Branka HORVAT Gilles UZE	Directrice de Recherche, Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon Directeur de Recherche, Université Montpellier II Sciences et Techniques
Dir. de thèse :	Jean-François FONTENEAU Chargé de Recherche, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers	

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, Dr. Gilles Uzé, Dr. Branka Horvat et Dr Pierre Cordelier, d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Je remercie chaleureusement Dr. Marc Grégoire de m'avoir accueillie au sein de son équipe pendant ces 4 dernières années qui ont été pour moi enrichissantes et inoubliables.

Je souhaite tout particulièrement exprimer ma gratitude envers mon directeur de thèse, Dr. Jean-François Fonteneau. Merci pour ton soutien, tes connaissances que tu as su me transmettre avec passion, nos discussions avec nos désaccords toujours argumentés, mais surtout, un grand merci pour ton optimisme et ton enthousiasme à chaque nouveau résultat !

Merci à tous nos collaborateurs qui ont rendu ces travaux possibles, Dr. Frédéric Tangy de l'Institut Pasteur à Paris, Dr. Philippe Erbs et toute son équipe de la société française Transgene, Dr. Didier Jean de Paris, Dr. Christian Münz et Dr. Monique Gannagé de Zurich, Suisse, Dr. John Bell et Dr. Fabrice Le Bœuf de Toronto, Canada, Dr. Antonio Chiocca de Boston, USA, Dr. Kristine Vaivode et Dr. Dace Pjanova de Riga, Lettonie et Dr. Yaohe Wang de Londres, Angleterre.

Enfin, je tiens à remercier les membres de mon comité de thèse, Dr. Housseem Benlalam et le Dr. Christelle Retière qui ont suivi l'évolution de ma thèse pendant ces dernières années.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	3
SOMMAIRE	4
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	7
INTRODUCTION	9
Partie I - Mésothéliome pleural malin	10
I. Description de la pathologie.....	10
A. Généralités	10
B. Histoire du MPM	10
C. Description physiopathologique du MPM.....	11
D. Epidémiologie.....	12
II. Etiologie	12
A. L'amiante.....	13
1) Propriétés	13
2) Toxicité.....	13
3) Localisation et rétention des fibres d'amiantes	14
B. Le virus simien 40	14
C. Prédisposition génétique.....	15
III. Processus de tumorigenèse	15
A. Altération cellulaires.....	16
B. Altérations moléculaires.....	16
1) Altérations chromosomiques et gènes mutés	16
2) Voies moléculaires.....	17
IV. Diagnostic et pronostic.....	18
A. Manifestation clinique.....	19
B. L'imagerie	19
C. L'analyse cytologique	20
D. L'analyse cytogénétique	20
E. L'analyse immunohistochimique.....	20
F. Les biomarqueurs solubles	21
V. Traitements.....	22
A. Chirurgies.....	22
B. Radiothérapies.....	22
C. Chimiothérapies	23
D. Traitement multimodal	23
E. Thérapies ciblées	24
F. Agents épigénétiques	25
G. Immunothérapies	25
Partie II – Immunothérapie oncolytique	28
I. Historique.....	28
II. Principe de l'immunothérapie oncolytique.....	29
A. Caractéristiques intrinsèques des cellules tumorales et réplication virale	30
B. Concepts de l'immunosurveillance à l'immunoediting des cancers.....	32
C. Réponse immunitaire antitumorale et l'immunité oncolytique.....	34
1) Réponse immunitaire antitumorale	35
a) Théorie du danger	35
b) Mort cellulaire immunogène	35
c) Initiation de la réponse immunitaire.....	36
d) Activités cytotoxiques lors de la phase effectrice antitumorale	39
2) Virus oncolytiques et réponse immunitaire antitumorale	41
III. Virus oncolytiques.....	44
A. Virus de la rougeole.....	45
1) Classification et structure	45
2) Cycle réplicatif	45

3)	Pathogénicité et Symptômes	46
4)	Tropisme cellulaire	47
5)	Fonction des protéines C et V dans la pathologie	47
6)	Vaccination	48
7)	Activité oncolytique	49
a)	Sécurité et avantages	49
b)	Tropisme tumoral naturel	49
B.	Virus de la vaccine	50
1)	Classification et structure	50
2)	Cycle réplcatif	51
3)	Les souches vaccinales et techniques d'atténuation	52
4)	Activité oncolytique	53
a)	Sécurité et avantages	53
b)	Tropisme tumoral redirigé	54
C.	Virus de la stomatite vésiculaire.....	55
D.	Virus de l'herpès simplex.....	57
E.	Entérovirus de type Echovirus.....	58
F.	Adénovirus.....	58
G.	Cancers sensibles aux virus oncolytiques.....	60
IV.	Ingénieries des virus oncolytiques	61
A.	Optimiser la spécificité	63
B.	Améliorer la traçabilité.....	65
C.	Armer les virus oncolytiques	66
D.	Bloquer l'angiogenèse	67
E.	Optimiser l'immunogénicité des virus oncolytiques	68
V.	Etudes précliniques	69
A.	Modèles immunocompétents	69
B.	Modèles murins humanisés.....	71
VI.	Essais cliniques	72
A.	Virus de la rougeole en clinique	73
B.	Virus de la vaccine, le JX-594.....	74
C.	Virus de l'herpès simplex, le Talimogene Laherparepvec	75
D.	Adénovirus, les souches ONYX-015 et CG0070	77
E.	Autres virus en clinique	77
Partie III – Réponse antivirale cellulaire innée		79
I.	Voie interféron de type I, première ligne de défense cellulaire	79
A.	Reconnaissance du pathogène	79
1)	La famille des Toll-like receptors (TLRs).....	80
2)	Les récepteurs cytosoliques.....	80
a)	Les RIG-I-like receptors (RLRs).....	80
b)	Les AIM2-like receptors (ALR)	82
c)	Autres détecteurs cytoplasmiques	82
B.	Signalisations MAVS et STING	83
1)	Signalisation MAVS	83
2)	Signalisation STING	84
C.	Relocalisation nucléaire des facteurs de transcription.....	85
D.	Gènes interférons de type I et leurs récepteurs.....	86
1)	Interféron bêta	87
2)	Interféron alpha.....	88
3)	Récepteur IFNAR.....	88
E.	Signalisation IFNAR.....	88
F.	Gènes stimulés par les interférons	89
1)	Famille Mx	90
2)	Famille IFITM	91
3)	ISG15.....	91
4)	Famille IFIT.....	92
5)	Protéine PKR	92

6) OAS/RNaseL.....	93
7) RSAD2	93
8) BST2	94
II. Mécanisme de désensibilisation de la voie IFN de type I	94
III. Les voies interférons de type II et III	95
IV. Induction des ISG par les voies non canoniques	95
V. Réponse antivirale cellulaire et immunothérapie oncolytique	97
A. Défauts des réponses antivirales cellulaires spécifiques au cancer	97
B. Échappement viral à l'immunité cellulaire	97
CONTEXTE & OBJECTIFS de THÈSE	100
RÉSULTATS	104
Article n°1: Frequent bi-allelic deletions of the type I interferon genes in pleural mesothelioma confer sensitivity to oncolytic measles virus	105
Article n°2: High oncolytic activity of a double deleted Vaccinia Virus Copenhagen strain against pleural mesothelioma	153
Article n°3: Oncolytic viruses sensitize human tumor cells for NY-ESO-1 tumor antigen recognition by CD4+ effector T cells.....	173
DISCUSSIONS.....	189
RÉFÉRENCES	214
ANNEXES.....	249
Annexe n°1: Sensitivity of human pleural mesothelioma to oncolytic measles virus depends on defects of the type I interferon response.....	250
Annexe n°2: Induction of immunogenic tumor cell death by attenuated oncolytic measles virus... ..	263
Annexe n°3: Oncolytic virotherapy for human malignant mesothelioma: recent advances.	271
Annexe n°4 : Présentations orales réalisées au cours de la thèse à des congrès nationaux et internationaux.....	279
Annexe n°5 : Présentations posters réalisées au cours de la thèse à des congrès nationaux et internationaux.....	280
Résumé.....	282

LISTE DES ABRÉVIATIONS

µm : Micromètre	Protéine F : Protéine de Fusion
5-FC : 5-fluorocytosine	FADD : FAS-Associated via Death Domain
5-FU : 5-fluorouracile	F-araAMP : Fludarabine Phosphate
Ac : Anticorps	FAST : Fusion-Associated Small Transmembraire
AdV : Adenovirus	FDA : Food and Drug Administration
Ag : Antigène	Flt3L : FMS-like tyrosine kinase 3 Ligand
ALR : AIM2-like receptors	FPP : Farnesyl Diphosphate Synthase
AP-1 : Activator Protein 1	Protéine G : Protéine Glycoprotéine
ATF-2 : Activating Transcription Factor 2	GAF : Gamma interferon Activation Factor
ATP : Adénosine Triphosphate	GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating
BAP1 : BRCA1 Associated Protein-1	Protéine H : Protéine Hémagglutinine
BCG : Bacille Calmette et Guérin	hCG : Human Chorionic Gonadotropin
BG8 : Blood Group 8	HER2/neu : Human Epidermal growth factor Receptor2
BiTE : Bispecific T-cell Engager	HGF : Hepatocyte Growth Factor
BOEC : Blood Outgrowth Endothelial Cell	HLA : Human Leukocyte Antigen
CAR : Coxsackie and Adenovirus Receptor	HMGB1 : High-Mobility Group Box 1
CD : Cluster of Differentiation	hNET : Récepteur de la Norépinéphrine
CD : Cytosine Désaminase	HPGD-15 : 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase
CDC : Complement-Dependent Cytotoxicity	HSP70 : Heat Shock Proteins 70
CDK : Cyclin-Dependent Kinase	HSV-1 : Herpès de Type 1
CDKN2A : Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A	ICD : Immunogenic Cell Death
CEA : Carcinoembryonic Antigen	iDNMT : Inhibitors of DNA Methyltransferases
CEV : Cell-associated Enveloped Virus	IFIT : Interferon Induced proteins with Tetratricopeptide repeats
cGAMP : cyclic Guanosine monophosphate–Adenosine Monophosphate	IFITM : Interferon-Induced Transmembrane
cGAS : cGAMP Synthase	IFN I : Interféron de type I
CIK : Cytokine-Induced Killer	IFN : Interféron
c-Met ou HGFR : Met/Hepatocyte Growth Factor Receptor	IFNAR : Interferon Alpha And Beta Receptor
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	IFNGR : Interferon gamma receptor 1
CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes	IGF-I : Insuline-Like Growth Factor
CPI : Immune Check Point Inhibitors	iHDAC : Histone Deacetylase Inhibitors
CrkL : CRK Like Proto-Oncogene	IKK : IκB Kinase
CT : Computerized Tomography	IL : Interleukin
CTA : Cancer Testis Antigens	IMIG : International Mesothelioma Interest Group
CTD : C-Terminal Domain	IMV : Intracellular Mature Virus
CTL : Cytotoxique des Lymphocytes	InVS : Institut de Veille Sanitaire
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4	IRF : Interferon Regulatory Factor
C-X-CL : Motif Chemokine 10	IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
DAF-3 : Decay Accelerating Factor-3	ISG : Interferon-Stimulated Genes
DAI : DNA-dependent Activator of IFN-regulatory factor	ISGF3 : Interferon-Stimulated Gene Factor 3
DAMPs : Damage-Associated Molecular Pattern	ISG NSD : ISG Non Strictement Dépendant des IFN I
DARPin : Designed Ankyrin Repeat Proteins	ISG SD : ISG Strictement Dépendant des IFN I
DRR : Durable Rate Response	ISRE : IFN-Stimulated Regulatory Elements
ECHO-7 : Enteric Cytopathogenic Human Orphan virus	JAK1 : Janus Kinase 1
EEV : Extracellular Enveloped Virus	JNK : c-Jun N-terminal Kinase
eGFP : Enhanced Green Fluorescent Protein	Kb : Kilobases
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor	KRAS : V-Ki-Ras2 Kirsten Rat Sarcoma 2 Viral Oncogene Homolog
eIF3e : Eukaryotic Initiation Factor 3	KSHV : Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus
EMA : Agence européenne du médicament	Protéine L : Large Protein (Polymérase)
EMT : Epithelial–Mesenchymal Transition	LDLR : Low Density Lipoprotein Receptor
EpCAM : Epithelial Cell Adhesion Molecule	LGP2 : Laboratory of Genetics and Physiology 2
EPR : Enhanced Permeability and Retention	LT : Lymphocyte T

Protéine M : Protéine de Matrice
MAM : Mitochondria-Associated Membranes
MAP-Kinase : Mitogen-Activated Protein Kinase
MART-1 : Melanoma-Associated Antigen Recognized by T cells
MAVS : Mitochondrial Antiviral-Signaling Protein
Mda5 : Melanoma Differentiation Associated gene 5
mDC : Myeloid Dendritic Cell
MDSC : Myeloid-Derived Suppressor Cells
MeP : 6-methylpurine
MIBG : Méta-Iodobenzylguanidine
miR : MicroRNA
MMP : Matrix Metalloproteinase
MPF : Megakaryocyte Potentiating Factor
MPM : Mésothéliome Pleural Malin
MV : Measles Virus
MX : MX Dynamin Like GTPase
Protéine N : Nucléocapside
NAP : Neutrophil Alkaline Phosphatase
NDV : Newcastle Disease Virus
NF2 : Neurofibromatose 2
NF- κ B : Nuclear Factor-Kappa B
MFN2 : Mitofusin 2
NK : Cellules « Natural killer »
NKT : T Natural Killer
NLRP3 : NOD-like Receptor Family, Pyrin Domain Containing 3
NRAS : Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog
NYCBH : New York City Board of Health
NY-ESO-1 : New York Esophageal Squamous Cell Carcinoma 1
OAS : Oligoadenylate Synthetase
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ORF : Open Reading Frames
OV : Oncolytic Virus
OVA : Ovalbumine
P/D : Pleurectomy / Decortication
Protéine P : Phosphoprotéine
PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Pattern
PD-1 : Programmed cell Death 1
pDC : Plasmacytoid Dendritic Cells
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PDGFR β : Beta-type Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PD-L1 : Programmed Death-Ligand 1
PF4 : Platelet Factor 4
pfu : Plaque-Forming Unit
PI3-K/AKT : Phosphoinositide 3-Kinase
AKT ou PKB : Protein kinase B
PIAS : Protein Inhibitor of Activated STAT
PKR : Protein Kinase R
PNP : Purine Nucléoside Phosphorylase
PPE : Pleuro-Pneumectomy Extrapleural
pRB : Retinoblastoma protein
PRD : Positive Regulatory Domain
PRR : Pattern Recognition Receptors
PS : Phosphatidylsérine
PSMA : Prostate-Specific Membrane Antigen
PVRL4 : Poliovirus Receptor-Related Protein 4
RAG2 : Recombinase Activating Gene-2
RD : Repressor Domain
RIG-I : Retinoic acid Inducible Gene I
RIP1 : Receptor-Interacting Protein 1
RLR : RIG-I-Like Receptors
RNP : Ribonucleoprotein
ROR : Rougeole-Oreillons-Rubéole
ROS : Reactive Oxygen Species
RR : Ribonucleotide Reductase
RSAD2 : Radical SAM Domain-containing 2
RVFV : Rift Valley Fever Virus
SCD : Super-Cytosine Deaminase
scFv : Single-chain Fragment variable
SH2 : Src Homology region 2
SLAM : Signaling Lymphocytic Activation Molecule
SMRP : soluble mesothelin-related peptides
SOCS : Suppressor Of Cytokine Signalling
SSTR2 : Somatostatin receptor type 2
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
STING : Stimulator of Interferon Genes
SV40 : virus simien 40 ou simian virus
TAA : Tumor Associated Antigen
TAP : Transporter Associated with antigen Processing
T-Vec : Talimogene Laherparepvec
TAM : Tumor-Associated Macrophages
TBK1 : TANK Binding Kinase 1
TCGA : The Genome Cancer Atlas
TCID50 : 50% Tissue culture Infective Dose
TCR : T Cell Receptor
TEP : Tomographie par Emission de Positons
TGF- β : Tumor Growth Factor- β
Th : T helper
TIL : Tumor-Infiltrating Lymphocytes
TK : Thymidine Kinase
TLR : Toll Like Receptor
TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α
TP53 : Tumor Protein 53
TRADD : TNFR1-Associated Death Domain protein
TRAF : TNF Receptor Associated Factors
TRAIL : Tumor-Necrosis-Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
Treg : Lymphocyte T régulateur
TRIF : TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
TRIM25 : Tripartite Motif-containing protein 25
TYK2 : Tyrosine-Protein Kinase 2
URPT : Uracil phosphoribosyltransferase
USP18 : Ubiquitin Specific Peptidase 18
VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VGf : Vaccinia virus Growth Factor
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
VV : Vaccinia Virus
WT : Wild Type
WT-1 : Wilms' Tumor 1
 β -gal : β -galactosidase

INTRODUCTION

Partie I - Mésothéliome pleural malin

I. Description de la pathologie

A. Généralités

Le mésothéliome malin est un cancer rare et très agressif des séreuses enveloppant les cavités abdominales et thoraciques. D'après l'institut national du cancer, le mésothéliome atteint principalement la plèvre (90%), le péritoine (10%) et exceptionnellement le péricarde et la muqueuse vaginale ou du testicule (<2%). Les patients atteints de mésothéliome pleural malin (MPM) présentent un mauvais pronostic avec une survie médiane variant de 6 à 12 mois ¹. Dans la majorité des cas, son diagnostic n'est posé que tardivement car les manifestations cliniques sont peu spécifiques et ne surviennent qu'à un stade avancé ².

Le MPM est majoritairement dû à une exposition prolongée aux fibres d'amiante. Malgré l'interdiction de son utilisation industrielle il y a plusieurs années en Europe, de nouveaux cas de mésothéliome continuent à apparaître en raison de la longue période de latence de la maladie. En effet, l'incidence de ce cancer dans les pays européens est d'environ 10 à 30 cas diagnostiqués par millions d'habitants avec une grande variation inter-pays ³ et un pic attendu en 2020 et au-delà ². De plus, l'amiante étant encore utilisée dans de nombreux pays du monde en développement et émergents, une épidémie mondiale potentielle de mésothéliome pourrait apparaître dans le futur ⁴.

Son diagnostic et le traitement représentent toujours un défi majeur pour les années à venir en raison de son agressivité, de sa résistance aux traitements actuels et de son incidence croissante.

B. Histoire du MPM

L'histoire du mésothéliome est complexe et remplie de controverses qui couvrent des années d'investigation médicale. La présence d'une tumeur localisée au niveau de la plèvre a d'abord été décrite en 1767 par Dr. J Lieutaud puis en 1819 par Dr. RTH Laennec. Cette notion fut par la suite contestée par le professeur d'anatomie pathologique Dr. KF Von Rokitansky

qui affirma que le cancer de la plèvre était toujours secondaire à un cancer primaire situé ailleurs dans le corps ^{5,6}. En 1931, le mésothéliome a été décrit en tant qu'entité par Dr. P Klemperer et Dr. CB Rabin mais cette caractérisation prit des années pour devenir largement acceptée ⁷.

Enfin, il a fallu attendre les années 60 pour établir la relation entre l'amiante et le MPM. Une étude épidémiologique réalisée en Afrique du Sud par Dr. JC Wagner a notamment reporté une série de cas de MPM chez des personnes travaillant dans les mines d'amiante ⁸.

C. Description physiopathologique du MPM

Le MPM atteint la plèvre, membrane séreuse mince composée de deux feuilletts qui recouvre la surface intérieure de la cavité thoracique (Figure 1). On distingue la plèvre viscérale qui recouvre les poumons tandis que la plèvre pariétale recouvre la paroi thoracique. Un fluide lubrifiant appelé liquide pleural est présent entre ces deux membranes afin d'assurer le mouvement continu de la cage thoracique et des poumons ⁷. En

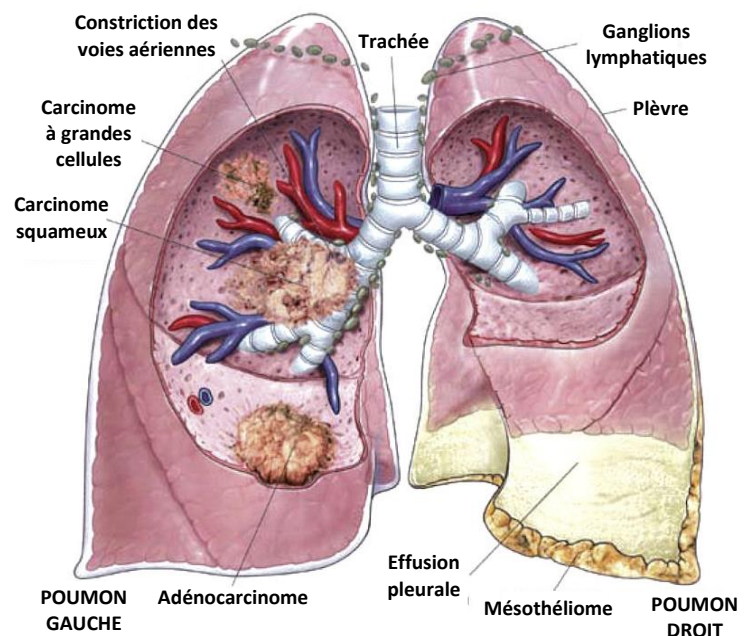


Figure 1. Représentation schématique de malignités du poumon tels que le mésothéliome pleural malin, l'adénocarcinome, le carcinome à cellules squameuses et larges.

2004 et 2015, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a réalisé une classification du MPM en trois sous types histologiques primaires afin de faciliter le diagnostic de cette tumeur. Ainsi, nous pouvons distinguer les MPM épithélioïde (50%-70%) caractérisé par des cellules cubiques et un noyau visible, sarcomatoïde (10%-20%) avec des cellules allongées en forme de fuseau, et les catégories mixtes ou biphasiques (10-40%) constituées d'un mélange des deux types cellulaires. L'histologie épithélioïde est la plus commune et a un meilleur pronostic contrairement au type sarcomatoïde beaucoup plus agressif ¹.

D. Epidémiologie

Bien que considéré comme un cancer rare en raison du nombre faible de cas de MPM déclaré par an dans le monde (1 à 2 par million), l'utilisation de l'amiante est encore largement présente dans de nombreux pays en développement et émergents. Une stabilisation de l'incidence du MPM à l'échelle mondiale n'est donc pas envisagée dans les années futures ⁴. En France, plus de 2200 cas de cancer liés à l'amiante (dont poumon, mésothéliome, larynx, ovaire) sont recensés chaque année selon le rapport de janvier 2015 de l'institut de veille sanitaire (InVS). Ils répertorient notamment dans ce rapport 678 à 915 nouveaux cas de MPM diagnostiqués et 615 à 822 décès attribués à une exposition à l'amiante au cours de l'année 2012 (InVS BEH 01/2015). L'utilisation de l'amiante a atteint son apogée dans les années 70-80 en France et fut interdite une vingtaine d'année plus tard. De par sa période de latence importante, le pic d'incidence du MPM est estimé aux environs de 2020 avec 1140-1300 nouveaux cas par an ⁹.

D'après la majorité des études épidémiologiques, les hommes sont décrits comme étant plus touchés par le MPM comparés aux femmes avec un ratio de 5/1. Cette différence peut largement s'expliquer par le fait que le MPM est un cancer professionnel attribuable aux minerais d'amiante ou l'on y retrouvait principalement des hommes ⁷. L'incidence chez les personnes professionnellement exposées est d'ailleurs 40 fois supérieure à celles non exposées. Enfin, le risque de développer un MPM étant dépendant de l'âge, il est 10 fois plus important chez les personnes de plus de 60 ans comparé à celles de moins de 40 ans ².

II. Etiologie

L'exposition à l'amiante est connue comme la cause principale du MPM. Cependant, d'autres facteurs potentiels ont été évoqués mais sont encore controversés dans la littérature. Nous retrouvons notamment l'exposition aux radiations ionisantes, au virus simien 40 (SV40) et à certains agents chimiques. Parallèlement, l'implication d'une prédisposition génétique est encore étudiée actuellement.

A. L'amiante

1) Propriétés

L'amiante, dérivée du terme grec pour «inextinguible» ou «indestructible», désigne une famille de minéraux fibreux naturels formés de silicate de magnésium hydraté et présents dans de nombreuses régions du monde. Son utilisation a été décrite pour la première fois dans l'antiquité et fut très variable au cours du temps, pour le tissage et la poterie par exemple. Cependant, l'exploitation minière de masse de ces minéraux ne débuta qu'au cours du 20^{ème} siècle. Les propriétés remarquables de l'amiante, telles que la résistance à la dégradation thermique, à la corrosion et à la traction, lui ont valu une large utilisation dans les matériaux de construction navale, d'immeubles, de voitures et fut même retrouvé dans des jouets ^{7,10}. Les minéraux d'amiante sont généralement classés en deux types, les serpentines et les amphiboles. Les serpentines, ou amiante blanc, sont composées de fibres courtes et frisées appelées chrysotiles et représentent 95% de l'usage commercial ¹¹. Les amphiboles composées de crocidolites (ou amiante bleu), d'amosites, de trémolites, d'anthophyllites et d'actinolites sont des fibres longues et droites (Figure 2) ⁷.



Figure 2. Principaux types de fibres d'amiante (Chrysotiles ou amiante blanc à gauche; Crocidolites ou amiante bleu au milieu; amosite à droite).

2) Toxicité

Les crocidolites sont considérées comme étant les plus cancérigènes et les principales responsables du mésothéliome. Plusieurs études ont néanmoins décrit la présence des chrysotiles comme un facteur de risque important dans de nombreux cancers ¹¹. La période de latence de l'exposition au développement de la maladie peut varier de 20 à 70 ans mais

peut être raccourcie en cas d'expositions intenses ¹². La relation dose-effet a été démontrée, mais il n'a pas été possible de déterminer un seuil minimum de non toxicité ^{1,13}. Suite à de nombreuses études confirmant les propriétés nocives et cancérogènes de l'amiante, son utilisation fut interdite après 1970 dans de nombreux pays tels que la France en janvier 1997, et très tardivement dans l'Union Européenne en 2005 ⁷.

3) Localisation et rétention des fibres d'amiantes

Le devenir des fibres d'amiante dans l'organisme dépend des caractéristiques de celles-ci. En effet, la longueur et le diamètre sont des facteurs clés de leur élimination ¹⁴. Grâce à un modèle artificiel *in vitro*, l'équipe du Dr. Stanson a montré que la cancérogénicité des fibres est liée à une taille de plus de 8µm et d'un diamètre supérieur à 1,5µm ¹⁵. Ces résultats ont ensuite été confirmés *in vivo* par l'équipe du Dr. Adamson qui a étudié l'induction de fibroses et de réponses prolifératives dans les poumons de souris par des fibres de crocidolites courtes et longues ¹⁶. Les fibres d'amiante de type amphibole et principalement les crocidolites étant d'une longueur supérieure à 5µm, elles sont donc considérées plus nocives que les types serpentines.

Les fibres d'amiante courtes inhalées arrivent dans l'espace pleural via les alvéoles pulmonaires. La cavité pleurale présente un système de drainage permettant l'acheminement des fibres vers les ganglions lymphatiques et les tissus lymphoïdes en passant à travers des ouvertures appelées stomates localisées sur la plèvre pariétale. Les fibres d'amiante trop longues sont quant à elles bloquées au niveau des ouvertures stomatiques et leur accumulation entraîne la formation de taches noires ou « black spot » conduisant à des sites cellulaires endommagés et enflammés avec une forte accumulation de macrophages qui tentent de phagocyter ces fibres retenues ^{17,18}.

B. Le virus simien 40

Le virus simien 40 (ou simian virus - SV40) est un virus à ADN qui fait partie de la famille des Polyovirus. Sa découverte remonte aux années 60 où il a été isolé dans le milieu de culture des premiers vaccins produits entre 1955 et 1963 contre la poliomyélite ¹⁹. De nombreuses études ont déterminé un lien entre ce virus et l'apparition d'un mésothéliome tandis que

d'autres études n'ont pas réussi à confirmer ces résultats. Une étude *in vivo* a notamment montré qu'une injection intracardiaque de SV40 chez des hamsters conduisait au développement de mésothéliome chez plus de 50% des animaux après 6 mois et 100% en injection intrapleurale ²⁰. De plus, le SV40 a la capacité, par la production de protéines oncogéniques, d'inactiver les suppresseurs de tumeurs p53 et pRB (Retinoblastoma protein) et de stimuler les oncogènes IGF-I (Insuline-like Growth Factor), c-Met et la voie des MAP-Kinase (Mitogen-Activated Protein Kinase). Ainsi, le SV40 participe à la transformation tumorale et l'immortalisation des cellules infectées ²¹⁻²³. Malgré ces études, l'implication du SV40 dans le développement du mésothéliome reste encore aujourd'hui un sujet très controversé.

C. Prédisposition génétique

Plusieurs rapports ont suggéré l'implication d'une prédisposition génétique dans le développement du mésothéliome. La preuve la plus marquante provient d'une région de Turquie où il a été retrouvé une forte quantité d'ériionite, une fibre minérale très cancérigène, dans les toitures de toutes les maisons. Pourtant, l'apparition de MPM était très répandue dans certaines familles et peu ou pas dans d'autres. Ce développement de MPM fut aussi retrouvé chez six générations de descendants des quelques familles très sensibles à la carcinogénèse de ces fibres sous un mode d'hérédité autosomique dominante. L'exposition à l'ériionite associée à une prédisposition génétique fut annoncées comme les causes de ces MPM ^{24,25}. Récemment, des études ont relié la prédisposition génétique à des mutations du gène *BAP1* (BRCA1 Associated Protein-1). En effet, de nombreux cas de MPM sporadiques présentent des mutations somatiques de *BAP1* contrairement aux MPM familiaux qui présentent des mutations germinales de ce gène ²⁵.

III. Processus de tumorigenèse

Le mésothéliome pleural malin présente de nombreuses altérations induites par la présence de fibres d'amiante conduisant à la tumorigenèse. On retrouve notamment des modifications cellulaires, génétiques et moléculaires très diverses qui vont favoriser la

division, la migration et l'angiogenèse et participer d'une part au processus d'inflammation chronique et d'autre part au développement d'une tumeur (Figure 3).

A. Altération cellulaires

La présence de fibres entraîne une irritation constante de la plèvre et induit des mécanismes de réparation tissulaire pro-inflammatoire. De plus, cette rétention va attirer les cellules du système immunitaire telles que les macrophages qui vont alors tenter d'ingérer les fibres sans succès entraînant une phagocytose dite contrariée ou frustrée ²⁶. La présence constante de cellules immunitaires en état d'alerte va induire une libération persistante de cytokines (TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α , TGF- β : Tumor Growth Factor- β , IL-6 : Interleukin-6 etc.) par les macrophages et un stress oxydatif. Ce stress se caractérise par un déséquilibre entre la production de ROS (Reactive Oxygen Species) et l'efficacité du système antioxydant à détoxifier ou réparer les dommages résultants. La présence de cytokines et de ROS participe à la réponse inflammatoire locale chronique engendrant l'apparition de la pathologie. Parallèlement, les fibres d'amiante ont à leur surface des particules de fer qui catalysent la synthèse de ROS et participent par cela à la carcinogenèse du MPM ^{27,28}.

B. Altérations moléculaires

1) Altérations chromosomiques et gènes mutés

De nombreuses aberrations chromosomiques ont été identifiées dans le mésothéliome grâce à des études cytogénétiques. Les régions fréquemment délétées sont localisées sur les bras chromosomiques 1p, 3p, 4q, 6q, 9p, 13q, 14q et 22q et les gains sont retrouvés principalement sur les chromosomes 1q, 5p, 7p, 8q et 17q ²⁹.

Le gène *NF2* (Neurofibromatose 2) situé sur la région 22q12 est l'un des premiers suppresseurs de tumeur à avoir été montré comme étant inactivé dans le MPM. Il code pour la protéine Merlin impliquée dans les jonctions adhérentes qui régulent l'adhésion intercellulaire. La perte de *NF2* favorise l'invasion et la propagation tumorale ^{30,31}. La région 9p21.3 portant le locus *CDKN2A* (Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2A) est l'altération la plus courante avec environ 60 à 80% des MPM délétés ^{29,32,33}. Ce locus code pour les suppresseurs

de tumeur p16^{INK4A} et p14^{ARF} qui sont des composants des voies de régulation du cycle cellulaire. En effet, la protéine p16 inhibe les kinases CDK4 et CDK6 (Cyclin-Dependent Kinase) activant ainsi la protéine pRB qui bloque le passage de la phase G1 à la phase S et la protéine p14 active le suppresseur de tumeur p53. En revanche, la mutation du gène *TP53* (Tumor Protein 53) codant la protéine p53 n'est retrouvée que dans 20% des cas de MPM qui est, en comparaison avec d'autres cancers humains, une fréquence très faible³⁴. Enfin, *BAP1*, cité précédemment, est une dé-ubiquitinase nucléaire qui joue un rôle dans les processus de réparation de l'ADN. Ce gène situé sur la région chromosomique 3p21.1 est soit délété soit muté de manière somatique ou germinale. *BAP1* a beaucoup été étudié pour sa potentielle implication dans la prédisposition génétique au mésothéliome²⁵.

2) Voies moléculaires

Il est maintenant admis que les fibres d'amiante jouent un rôle dans la formation de ROS impliquée dans l'inflammation. De plus, ces fibres participent à la réponse inflammatoire due à la libération de signaux de danger tels que HMGB1 (High-Mobility Group Box 1) par la nécrose des cellules mésothéliales³⁵. Parallèlement, de nombreuses voies de signalisation impliquées dans l'angiogenèse, la croissance et l'invasion tumorale sont activées dans le MPM. Des études ont montré une forte expression et autophosphorylation du facteur de croissance épidermique EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) dans les cellules mésothéliales exposées à des fibres d'amiante *in vitro*. Ce récepteur initie alors plusieurs cascades passant notamment par les MAP-Kinases et induit l'expression de proto-oncogènes tels que c-Fos et c-Jun et permet alors une forte croissance cellulaire^{36,37}. D'autres voies de facteurs de croissance tels que l'IGF-I³⁸, l'HGF (Hepatocyte Growth Factor) lié à la voie c-Met (ou HGFR, Met/Hepatocyte Growth Factor Receptor)³⁹ et le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor)⁴⁰ ont été décrites comme étant fortement activées lors du processus de tumorigenèse du MPM. Plusieurs Métallo-protéinases matricielles (MMP-1 et 2 : Matrix Metalloproteinase)⁴¹, l'acide hyaluronique⁴² et la fibrine⁴³ sont impliquées dans le processus de migration et d'invasion tumorale et surexprimées dans le MPM. Enfin, plusieurs études suggèrent que la voie PI3-K/AKT (phosphoinositide 3-kinase, AKT ou PKB pour Protein kinase B) serait constitutivement activée et jouerait un rôle dans l'induction des mécanismes anti-apoptotiques et d'angiogenèse, l'activation de la voie NF- κ B (Nuclear Factor-kappa B), favorise

l'activité télomérase et augmente l'invasion tumorale ⁴⁴. Savoir si les fibres d'amiante ont un effet direct sur l'induction de ces voies ou indirect via le stress oxydatif reste une question toujours en suspens. La compréhension des anomalies génétiques, moléculaires et cellulaires et l'implication de l'amiante dans ces processus pourraient permettre d'établir de nouvelles approches de diagnostic ou de traitement du MPM.

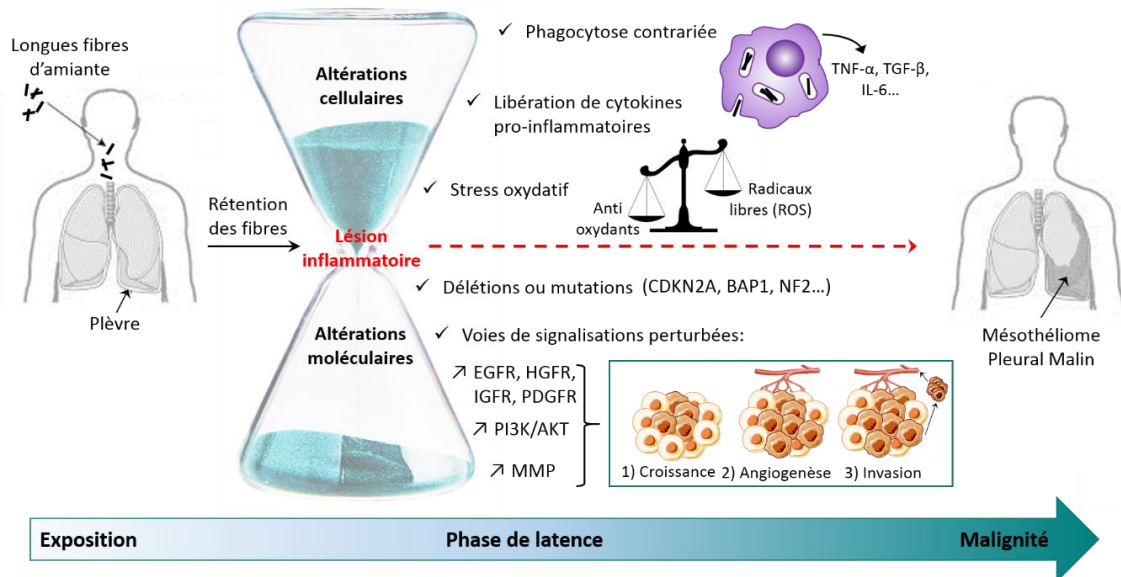


Figure 3. Tumorigenèse du MPM associée aux fibres d'amiante. Adapté de Port et al, 2017, Current Biology « Identical Routes to Malignancy from Asbestos and Carbon Nanotubes » ⁴⁵

L'inhalation et la rétention au niveau de la plèvre de longues fibres d'amiante entraîne une inflammation aiguë et chronique caractérisée par des altérations cellulaires (phagocytose contrariée et libération de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages et production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) entraînant un stress oxydatif) et des altérations moléculaires (délétions de gènes suppresseurs de tumeur et sur-activation de voies de signalisation cellulaire induisant la croissance tumorale, l'angiogenèse et l'invasion des tissus sains). Ces perturbations participent à l'apparition d'un mésothéliome pleural malin. EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor, HGFR: Hepatocyte Growth Factor Receptor, IGFR: Insuline-like Growth Factor Receptor, PDGFR: Platelet-Derived Growth Factor Receptor, PI3K/AKT: phosphoinositide 3-kinase/AKT, MMP: Matrix Metalloproteinase.

IV. Diagnostic et pronostic

Le diagnostic du mésothéliome pleural malin reste un vrai challenge pour la médecine actuelle. Ce cancer est l'une des pathologies les plus difficiles à diagnostiquer et, encore aujourd'hui, de nombreux patients ne reçoivent pas un traitement approprié à leur maladie suite à des erreurs de diagnostic. Les lignes directrices du diagnostic cytopathologique du MPM pour guider les médecins sont mises à jour fréquemment et les techniques se sont multipliées depuis ces dernières années. Cependant, les efforts pour trouver de nouveaux modes de diagnostic sont tout de même à poursuivre.

A. Manifestation clinique

Le MPM se caractérise par l'apparition de trois symptômes prédominant : un épanchement pleural correspondant à une augmentation du liquide pleural pouvant aller jusqu'à 1 à 2L contre 15mL pour un individu sain ; une dyspnée ou trouble de la respiration due à l'accumulation de liquide pleural ou à la masse tumorale et des douleurs thoraciques ¹. D'autres symptômes incluent la fatigue, l'anorexie, la perte de poids, des sueurs et des malaises sont aussi courants dans ce type de pathologie. Les manifestations cliniques du mésothéliome sont non spécifiques et souvent difficiles à distinguer des lésions pleurales bénignes. En effet, les épanchements pleuraux sont retrouvés plus fréquemment dans le cancer du poumon, du tractus gastro-intestinal et du pancréas chez l'homme et dans le cancer du sein, du poumon et de l'ovaire chez la femme. Moins de 1% des épanchements sont causés par un mésothéliome ⁴⁶. De plus, le temps de latence de ce cancer peut atteindre plus de 40 ans et les premiers symptômes apparaissent souvent à un stade avancé, il devient alors très agressif avec un pronostic globalement défavorable et une médiane de survie d'environ un an. Du fait de sa durée de latence, de la non spécificité de ses symptômes et de son agressivité, le diagnostic de ce cancer est réalisé, dans la majorité des cas, très tardivement ⁹.

B. L'imagerie

La radiographie thoracique est la première étape du diagnostic d'un MPM. Il existe plusieurs méthodes d'imagerie qui permettent de fournir rapidement des informations sur la présence d'une masse, d'un épanchement et d'un épaississement de la plèvre. La tomodensitométrie (CT: Computerized Tomography) permet de diagnostiquer un épaississement pleural et d'évaluer la taille des ganglions lymphatiques ⁴⁷. La tomographie par émission de positons (TEP) et d'imagerie par résonance magnétique (IRM) peuvent apporter des informations supplémentaires en évaluant l'invasion métastatique ^{48,49}. Enfin, des examens complémentaires peuvent être envisagés tels que la laparoscopie pour visualiser une propagation dans la cavité péritonéale et la thoracoscopie assistée par vidéo pour exclure la propagation dans le poumon et nécessaire pour réaliser une biopsie de la région suspecte ⁵⁰. Les techniques d'imagerie permettent d'établir un premier diagnostic qui n'est cependant pas

totalemment fiable et spécifique du MPM et nécessite donc d'être associées à d'autres techniques plus pointues.

C. L'analyse cytologique

Un des symptômes les plus fréquemment rencontré en cas de MPM est un épanchement pleural. Afin de soulager le patient, ce liquide est ponctionné et peut être utilisé pour une analyse cytologique. Cette analyse est cependant loin d'être spécifique au MPM. En effet, il n'est pas possible de différencier un MPM d'un adénocarcinome pleural ou d'une métastase provenant d'un autre cancer ⁵¹.

D. L'analyse cytogénétique

L'analyse cytogénétique est basée sur les anomalies moléculaires reconnues récemment comme pouvant être intéressantes dans le diagnostic du type de mésothéliome et de son pronostic. Nous avons vu précédemment que les modifications génétiques les plus courantes sont les inactivations des suppresseurs de tumeur NF2, p16INK4a, p14ARF et BAP1. Des études ont montré que la perte de *CDKN2A* (p16/p14), corrélée avec un mauvais pronostic, pouvait être détectée par la technique d'hybridation fluorescente in situ (FISH) afin de dissocier les mésothéliomes bénins et malins ⁵². D'après une étude réalisée par le Dr. Cigognetti et al, la perte de *BAP1* détectée par immunohistochimie pourrait être particulièrement utile dans le diagnostic différentiel des proliférations du mésothéliome de type épithélioïde ⁵³. La perte de *CDKN2A* et de *BAP1* n'étant pas spécifique du mésothéliome mais aussi d'autres tumeurs, les diagnostics standards restent donc essentiels ^{54,55}.

E. L'analyse immunohistochimique

L'étude immunohistochimique du MPM est la technique de diagnostic la plus efficace et la plus fiable. En 2015, la classification des tumeurs de la plèvre réalisée par l'OMS en 2004 a été rediscutée et améliorée pour permettre un meilleur diagnostic par les médecins. L'immunohistochimie, réalisée sur des fragments de tissus cancéreux obtenus par biopsie,

permet une meilleure distinction du MPM et de divers cancers, y compris l'adénocarcinome pulmonaire, le cancer du poumon, du sein, de l'ovaire, du côlon, etc. Un panel de marqueurs spécifiques a été établi car il n'existe pas de marqueurs ayant une spécificité de 100% pour le MPM. D'après les recommandations du Groupe international d'intérêt mésothéliome (IMIG : International Mesothelioma Interest Group), il est nécessaire de coupler au moins deux marqueurs de MPM et deux marqueurs d'adénocarcinome pulmonaire dont leur spécificité et sensibilité sont supérieures à 80% pour valider le diagnostic différentiel. Les marqueurs de MPM les plus classiquement analysés sont la calrétinine, la cytokératines 5/6, le WT-1 (Wilms' Tumor 1) et le D2-40 (ou podoplanine). Les marqueurs d'adénocarcinome pulmonaire sont l'antigène carcinoembryonnaire (CEA : Carcinoembryonic Antigen), B72.3, BG8 (Blood Group 8), BerEP4, et MOC-31. Le diagnostic est confirmé lorsqu'au moins deux marqueurs de MPM sont positifs et deux marqueurs d'adénocarcinome sont négatifs ^{55,56}. En France, le diagnostic d'un MPM est automatiquement validé par un anatomopathologiste appartenant au réseau Mésopath. De plus, l'IMIG précise qu'au cours du diagnostic, le pathologiste ne devra pas tenir compte des antécédents du patients, notamment son exposition potentielle à l'amiante ^{54,55}.

F. Les biomarqueurs solubles

L'identification de biomarqueurs sériques et pleuraux est un enjeu majeur pour le diagnostic précoce du MPM et le suivi du développement de la pathologie. Les principaux biomarqueurs étudiés pour prédire le mésothéliome sont la mésothéline soluble (SMRP : Soluble Mesothelin-Related Peptides) ^{57,58}, l'acide hyaluronique ^{59,60}, le facteur mégacaryocytes de potentialisation (MPF : Megakaryocyte Potentiating Factor) ⁶¹, l'ostéopontine ⁶² et la Fibuline-3 ⁶³. Cependant, ces marqueurs sont à considérés seulement comme des informations pronostiques qui doivent être évalués en complément de l'analyse radiologique et immunohistochimique. Notre équipe a participé à la mise en évidence de nouveaux marqueurs de MPM et d'adénocarcinome pulmonaire prometteurs à partir de liquides pleuraux tels que le collagène de type III (Col3A1 : Collagen Type III Alpha 1 Chain), la chimiokine CCL2 (CCL2 : Chemokine (C-C motif) Ligand 2) et la galactine-3 ⁶⁴. Nous avons notamment évalué l'amélioration de la sensibilité du diagnostic lors de la combinaison des marqueurs CCL2/SMRP/Galectine-3 ⁶⁵.

V. Traitements

Le MPM est un cancer très agressif avec une survie médiane de 6 à 12 mois et une incidence mondiale en constante augmentation ¹. À ce jour, aucun traitement curatif efficace n'a pourtant été validé pour le traitement de ce cancer. Le traitement actuel de référence est une chimiothérapie couplant le pemetrexed et le cisplatine (ou sel de platine) qui ne permet d'augmenter la survie médiane des patients seulement de quelques mois. Comme le diagnostic du MPM est très souvent établi à un stade avancé ^{56,66}, certains traitements conventionnels tels que la chirurgie radicale sont souvent peu efficace et par conséquent peu recommandés. De plus, la plupart des patients présentent déjà une chimiorésistance avant le début des traitements. A l'heure actuelle, les progrès pour traiter le MPM restent modestes, il semble donc indispensable d'élargir les recherches sur ce sujet afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques ⁶⁷.

A. Chirurgies

L'utilisation de la chirurgie comme traitement du MPM est très controversée car son efficacité est limitée aux patients qui présentent un stade précoce de développement (stade I-a selon l'IMIG) et diagnostiqués à temps, soit 1 à 2% des patients ⁶⁶. Le MPM a tendance à croître de manière diffuse ce qui rend la résection complète de la tumeur difficile. Deux procédures chirurgicales peuvent être appliquées, la pleurectomie/décortication (P/D : Pleurectomy/Decortication) correspondant à une résection de la plèvre pariétale et viscérale et la pleuro-pneumectomie extrapleurale (PPE : Pleuro-Pneumectomy Extrapleural) qui consiste à réséquer la totalité du poumon, de la plèvre, du péricarde et une partie du diaphragme. La P/D présente un taux déclaré de récurrence locale et une mortalité plus faible que la PPE (1,5% à 5% et 3,4% à 10%, respectivement) ^{2,68}. Dans l'ensemble, il est reconnu que la P/D est mieux tolérée que la PPE, procédure très lourde et invasive ⁶⁹. Au vu de la faible efficacité de cette approche, la meilleure option à l'heure actuelle pour prolonger la survie du patient reste la chimiothérapie ^{2,47}.

B. Radiothérapies

La radiothérapie radicale ne peut être utilisée dans le cas du MPM car le rayonnement intense de cette technique pourrait causer une toxicité considérable aux organes adjacents tels que le cœur et les poumons ⁷⁰. La radiothérapie prophylactique permet d'éviter une récurrence locale au niveau du site de ponction du liquide pleural et après une intervention chirurgicale de type PPE. Cette stratégie permet aussi de soulager le patient des douleurs après une chirurgie ².

C. Chimiothérapies

La chimiothérapie combinant le cisplatine et le pemetrexed est considérée comme le seul traitement de référence pour le MPM. Le cisplatine, agent alkylant de l'ADN ⁷¹, et le pemetrexed, antagoniste de l'acide folique ⁷², ont la capacité d'inhiber la réplication et d'induire la mort préférentielle des cellules cancéreuses. L'efficacité de cette association a été démontrée au cours d'un essai clinique de phase III publié par le Dr. Vogelzang et al en 2003 et permet une augmentation de la médiane de survie de 3,2 mois par rapport au cisplatine seul ⁷³. Cependant, les modalités d'utilisation sont sans cesse optimisées puisqu'une phase II est en cours d'analyse pour déterminer le nombre de cycle le plus favorable au traitement du MPM (NCT02497053). Par ailleurs, des phases II ont démontré que le cisplatine pouvait être substitué par la carboplatine moins toxique pour l'organisme ⁷⁴. L'effet bénéfique de la gemcitabine seul ou en association avec du cisplatine a aussi été souligné dans d'autres études ⁷⁵. Un essai de phase III est nécessaire afin de comparer ces différentes approches ⁶⁷.

D. Traitement multimodal

La stratégie multimodale consiste à coupler la chimiothérapie avec le pemetrexed et le cisplatine administrée en premier lieu, suivi d'une chirurgie de type PPE puis d'une radiothérapie post-opératoire chez des patients atteints de MPM. L'essai clinique de phase II (EORTC, protocole 08031) a étudié la faisabilité de la thérapie trimodale chez 60 patients. La durée de survie globale médiane pour les 57 patients admissibles était de 18,4 mois dont 33 mois pour les 37 patients ayant terminé le traitement trimodal ⁷⁶. Néanmoins, si la faisabilité de cette approche a été démontrée, le temps de traitement global est considéré comme très lourd et très long par rapport au bénéfice apporté.

E. Thérapies ciblées

La thérapie ciblée consiste à utiliser des molécules chimiques, des anticorps ou même des siRNA spécifiques d'une protéine ou d'un mécanisme impliqué dans le développement tumoral. Ces dernières années, les études pour cibler les voies de signalisation et les protéines impliquées dans divers processus tumoraux ont suscité un intérêt considérable pour le traitement du MPM (Figure 4).

Les chercheurs ont multiplié le nombre d'études sur des molécules pouvant inhiber les voies de signalisation de facteurs de croissance telles que l'EGFR, la voie de l'insuline et la voie Met/HGF etc. Toutes ces voies ont des fonctions souvent communes dans les processus de croissance et de survie cellulaire, de motilité et d'invasion du MPM. Plusieurs essais cliniques de phase II ont vu le jour ces dernières années. Les inhibiteurs de l'EGFR, erlotinib et gefitinib, n'ont pas donné de résultats concluants pour le MPM^{77,78} mais sont toujours en cours sur le mésothéliome péritonéal (NCT01592383). Le cixutumumab (IMC-A12), un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur à l'insuline IGF-1R, a été évalué lors d'une phase II chez des patients atteints de mésothéliome après avoir montré son efficacité *in vivo*⁷⁹. Les résultats n'ont pour l'instant pas donné lieu à une publication (NCT01160458). L'inhibition de la voie Met par le Tivantinib ou par des siRNA ciblant spécifiquement c-Met a montré leur capacité à induire l'apoptose et à bloquer la croissance cellulaire des cellules de MPM *in vitro* et *in vivo*^{80,81}. Enfin, l'inactivation des composants de la cascade PI3K/mTOR pourrait être une stratégie intéressante à adopter étant donné que plusieurs voies de facteurs de croissance activées dans le MPM, convergent vers cette voie⁶⁷.

L'angiogenèse est une étape clé de la pathogénèse du MPM. Les VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor) et PDGFR β (Beta-type Platelet-Derived Growth Factor Receptor) impliqués dans ce processus sont surexprimés dans 20 à 71% et 30 à 45% des MPM, respectivement^{82,83}. Par conséquent, les constituants des voies angiogéniques sont des cibles intéressantes pour la thérapie du mésothéliome. Le Bévacicumab ou plus connu sous le nom d'Avastin[®] est un anticorps neutralisant le VEGF. Son effet seul n'a pas mis en évidence d'amélioration de la survie. Cependant, l'association du Bévacicumab au pémétréxed et au cisplatine a fait l'objet d'un essai clinique de phase III en 2016 sur 448 patients⁸⁴ (NCT00651456). La survie médiane des patients s'est élevée à 18,82 mois avec la combinaison comparée au 16,07 mois avec le traitement chimiothérapeutique seul⁶⁷.

F. Agents épigénétiques

Le MPM a été décrit pour présenter de nombreuses altérations génétiques, tel que des délétions et des gains chromosomiques, des méthylations de l'ADN et des acétylations des histones anormales. En effet, Les mécanismes d'hyperméthylation de suppresseurs de tumeurs, d'hypométhylation d'oncogène et l'affaiblissement des interactions histones/ADN par acétylation permet la régulation de l'expression génique et favorise le processus de tumorigenèse ⁸⁵. Par conséquent, plusieurs essais cliniques ont évalués le potentiel d'inhibiteurs d'histones désacétylases (iHDAC : Histone deacetylase inhibitors) et d'ADN méthyltransférases (iDNMT : inhibitors of DNA methyltransferases) ^{86,87} (Figure 4).

G. Immunothérapies

L'implication du système immunitaire a largement été reconnue dans le contrôle de la croissance tumorale. La présence d'infiltrat lymphocytaire dans la tumeur et d'un taux élevé d'anticorps dirigés contre les cellules tumorales chez les patients souffrant d'un MPM a notamment été corrélée avec un bon pronostic ⁸⁸. Pour cette raison, les efforts des chercheurs ont été portés depuis quelques années à une meilleure compréhension du rôle du système immunitaire et le développement de nouvelles approches immunothérapeutiques. Ainsi, l'injection dans les cellules tumorales de cytokines (IL-2, GM-CSF Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, Interféron- α et β) a fait l'objet de plusieurs essais cliniques et a pour objectif de stimuler le système immunitaire de manière non spécifique ⁸⁹⁻⁹². Parallèlement, des stratégies inverses consistant à inhiber les cytokines immunosuppressives par des anticorps bloquants spécifiques ont été testées. Ces stratégies n'ont cependant pas fourni de preuves réelles d'un bénéfice thérapeutique supérieur à ceux obtenus par d'autres stratégies ⁹³. D'autre part, malgré l'absence d'antigène spécifique du MPM, certains antigènes tumoraux surexprimés peuvent cependant être ciblés telle que la protéine membranaire mésothéline, dont la forme soluble décrite précédemment peut intervenir dans le diagnostic du mésothéliome. Actuellement, des essais cliniques sont en cours d'évaluation pour déterminer l'efficacité d'anticorps anti-mésothéline tels que l'Amatuximab en combinaison avec le pemetrexed et le cisplatine (NCT02357147) ⁹⁴. Par ailleurs, le transfert adoptif de lymphocytes T (LT), consistant à rediriger les cellules T du patient spécifiquement contre un

antigène de tumeur telle que la mésothéline est actuellement en cours d'étude clinique de phase I/II (Figure 4).

Ces dernières années, plusieurs mécanismes d'inhibition de la réponse immunitaire antitumorale médié par les LT ont été identifiés. Ainsi, des anticorps monoclonaux appelés inhibiteurs de point de contrôle immunitaire (CPI : immune Check Point Inhibitors) ont été développés contre les molécules clé de ces processus telles que CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4), PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1) et PD-1 (Programmed cell death 1) ⁹⁵. Cette stratégie est considérée comme la révolution de l'immunothérapie en raison des résultats impressionnants et très encourageants obtenus dans un grand nombre de cancers ⁹⁶⁻⁹⁹.

La protéine CTLA-4 exprimée sur les LT activés interagit avec les molécules de costimulation CD80 et CD86 sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et participe à modérer l'activation des lymphocytes T par une boucle de rétrocontrôle négative. De plus, les lymphocytes T régulateurs (Treg) expriment de manière constitutive CTLA-4 qui participe à leur fonction suppressive des réponses T. Dans le cadre du mésothéliome, l'utilisation d'anti-CTLA-4 en association avec la chimiothérapie a montré son efficacité chez des modèles murins ¹⁰⁰⁻¹⁰². Le tremelimumab, un anticorps monoclonal anti-CTLA-4, a été testé lors d'un essai clinique de phase II sur 29 patients (MESOT-TREM-2008 (NCT01649024)). La médiane de survie était de 10,7 mois avec un taux de survie de 48,3% à 1 an et 36,7% à 2 ans. Plus tard, une seconde étude a été réalisée avec des doses plus faibles de tremelimumab mais avec des cycles d'injection plus rapprochés et a montré une survie médiane de 10,9 mois (MESOT-TREM-2012 NCT01655888) ¹⁰³. Récemment, une étude multicentrique internationale (DETERMINE NCT01843374) sur 564 patients souffrant d'un MPM ou d'un mésothéliome péritonéal a montré que le tremelimumab n'a pas atteints ses objectifs en terme de survie global ¹⁰⁴.

La molécule PD-L1 est une protéine de surface dont l'expression est induite par l'IFN- γ produits par les LT et les cellules « Natural killer » (NK). Comme pour CTLA-4, la fixation à son récepteur, la protéine PD-1, limite l'activation des cellules T par une boucle de rétrocontrôle négatif. D'autre part, la protéine PD-L1 est surexprimée par les cellules tumorales afin d'inhiber leur reconnaissance et leur lyse par les LT. Leur évaluation dans le MPM a débuté récemment et peu de résultats sont disponibles pour le moment. Le pembrolizumab, un anti

PD-1, a permis une stabilisation de la maladie de 52% de patients (13/25) atteints de MPM lors de la phase Ib (KEYNOTE-028 NCT02054806)¹⁰⁵ et la phase II devrait donner ses résultats définitifs en mars 2020 (NCT02399371). Enfin, l'effet de l'anti PD-1 nivolumab, combiné ou non à l'anti CTLA-4 ipilimumab, donnera ses résultats préliminaires cette année (MAPS2 NCT02716272). L'efficacité obtenue avec les inhibiteurs de CTLA-4 s'est révélée décevante dans le traitement du MPM. Néanmoins, les résultats de plusieurs essais cliniques impliquant des inhibiteurs de PD-1 seul ou en combinaison sont attendus avec optimisme (Figure 4).

Enfin, un intérêt croissant s'est porté sur l'immunothérapie oncolytique basée sur l'utilisation de virus oncolytiques pour traiter le cancer¹⁰⁶. Cette stratégie sera développée plus en détails dans la partie II de ce mémoire.

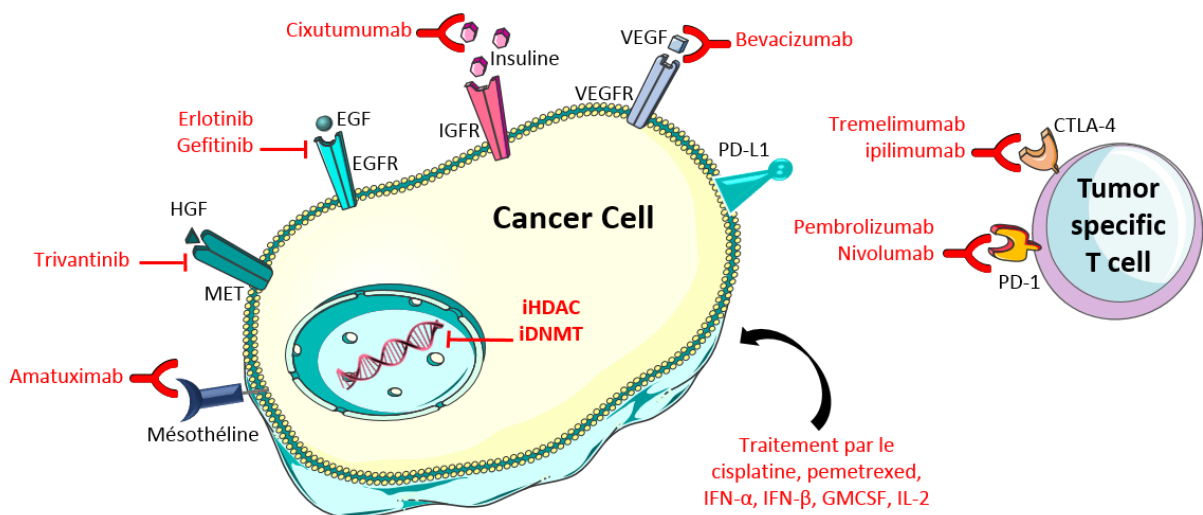


Figure 4. Schéma récapitulatif des stratégies thérapeutiques pour le traitement du MPM. Adapté de la revue Bonelli et al, 2017, Biochemical Pharmacology « New therapeutic strategies for malignant pleural mesothelioma »⁶⁷

Conclusion partie I

Le MPM présente une morbidité importante en raison du temps de latence, des difficultés rencontrées au diagnostic et de l'efficacité limitée des traitements actuels. La plupart des cancers ont bénéficiés ces dernières années d'une diversification des stratégies thérapeutiques. Néanmoins, ces avancés ont montré des résultats modérés chez les patients atteints de MPM. Il est donc essentiel de poursuivre les efforts afin d'apporter de nouvelles solutions de traitements. L'immunothérapie oncolytique, étudiée au cours de ma thèse, est une stratégie prometteuse pour le traitement du mésothéliome et plusieurs essais cliniques sont attendus avec espoir.

Partie II – Immunothérapie oncolytique

L'immunothérapie oncolytique est basée sur l'utilisation de virus réplicatifs ou génétiquement modifiés pour cibler et lyser préférentiellement les cellules cancéreuses. Elle a ainsi pour objectif de stimuler le système immunitaire du patient afin d'engendrer une régression de la tumeur et de développer une réponse antitumorale à long terme. Cette nouvelle approche est actuellement en plein essor et donne des résultats précliniques et cliniques très prometteurs dans un large éventail de cancers.

Dans cette partie, je décrirai le principe de l'immunothérapie oncolytique et je vous présenterai les 6 virus oncolytiques que j'ai étudiés au cours de ma thèse. Cependant, seuls les virus de la rougeole et de la vaccine, mes deux modèles d'études principaux, seront décrits en détails.

I. Historique

En 1898, Dr. M Beijerinck isola l'agent responsable de la mosaïque du tabac sur des filtres de Chamberland, utilisés à l'époque pour éliminer les bactéries. La première définition du virus, « Contagium vivum fluidum » signifiant germe vivant soluble, fut adoptée. Il a fallu cependant attendre 1939 pour observer pour la toute première fois une image de virus au microscope électronique. Par la suite, les études pour comprendre les virus et leur fonctionnement se sont intensifiées et ont fait l'objet de découvertes majeures dans de nombreux domaines, tels que la virothérapie ¹⁰⁷.

L'émergence de l'utilisation des virus oncolytiques fut due à une découverte fortuite plutôt qu'à une hypothèse longuement élaborée. En effet, c'est au cours des années 1850 à 1900 que des chercheurs ont fait l'observation de régressions tumorales consécutives à une infection virale. Le rapport du Dr. Dock en 1896 décrit une patiente présentant une régression d'une leucémie myéloïde suite à l'infection par la grippe ¹⁰⁷. D'autres rapports ont fait état de régressions souvent courtes et partielles de leucémie ¹⁰⁸⁻¹¹⁰, de la maladie de Hodgkin ^{111,112} et du lymphome de Burkitt ¹¹³ faisant suite à des infections provoquant la varicelle, des hépatites ou la rougeole. Les tentatives de traitements de l'époque furent pour le moins paradoxales puisque les premiers tests consistaient à administrer des sérums ou extraits de tissus infectés

par le virus de l'hépatite B, qui peut, à long terme, être responsable d'un cancer du foie. Sur 21 patients, plus de la moitié développèrent une hépatite et 7 d'entre eux présentèrent une courte amélioration de la maladie ¹⁰⁷. Par la suite, Le virus du Nil Occidental a été évalué dans de nombreuses études sur des rongeurs et chez l'homme entre les années 50 et 80 ¹¹⁴ mais fut pourtant remplacé par des virus plus efficaces et plus sûrs tels que les adénovirus, le virus de l'herpès, les *Paramyxovirus*, les *Picornavirus* et le virus de la vaccine. En 2004 et 2005, la commercialisation des deux premiers virus oncolytiques, l'entérovirus Rigvir et l'adénovirus H101, fût approuvée en Lettonie et en Chine, respectivement ^{115,116}.

Plus récemment, un virus de l'herpès de type 1 (HSV-1) modifié, appelé Talimogene Laherparepvec (T-Vec), fût le premier OV à être approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) aux États-Unis, l'Agence européenne du médicament (EMA) et l'Australian Therapeutic Goods pour le traitement du mélanome avancé ¹¹⁷. Actuellement, plusieurs autres virus oncolytiques ont atteint les essais cliniques de phase III comme le virus de la vaccine, le réovirus ou l'adénovirus pour le traitement de différents cancers.

II. Principe de l'immunothérapie oncolytique

L'immunothérapie oncolytique est basée sur l'utilisation de virus oncolytiques (OV : Oncolytic Virus) qui répliquent sélectivement dans les cellules tumorales et provoquent leur lyse tout en épargnant les cellules saines ¹¹⁸. Au cours de l'évolution de la tumeur, une pression de sélection de clones tumoraux invisibles au système immunitaire et résistants à l'apoptose favorise l'échappement des cellules tumorales aux mécanismes censés bloquer leur prolifération mais va aussi, à l'inverse, les rendre beaucoup plus sensibles à l'infection virale. L'immunothérapie oncolytique exploite donc les modifications cellulaires acquises par les tumeurs qui permettent une progression virale idéale. De plus, la mort cellulaire immunogène des cellules tumorales provoquée par l'infection virale stimule la réponse immunitaire antitumorale du patient.

A. Caractéristiques intrinsèques des cellules tumorales et réplication virale.

Le cancer fût défini en 2000 par les Dr. Hanahan et Weinberg en six caractéristiques biologiques acquises au cours de la tumorigenèse ¹¹⁹. Le premier critère majeur des cellules cancéreuses est leur capacité à proliférer de manière anarchique en produisant elles-mêmes une stimulation proliférative autocrine ou paracrine. Elles doivent aussi passer outre les programmes puissants qui répriment la croissance et la prolifération cellulaire. Ainsi, les suppresseurs *pRB*, *p53* et *CDKN2A* qui ont une importance prépondérante dans cette régulation négative sont fréquemment mutés et/ou délétés dans les tumeurs ^{120,121}. Parallèlement, les cellules tumorales acquièrent une résistance au processus de mort programmée ou apoptose qui se met en place en condition de stress physiologique ^{122,123}. Le quatrième critère est l'immortalité réplivative des cellules cancéreuses. Une cellule saine présente un nombre de divisions limitées régit par la taille des télomères aux extrémités de l'ADN puis entre dans un état irréversible non prolifératif appelé sénescence. Ce processus est contourné par les tumeurs en surexprimant la télomérase, ADN polymérase capable de rallonger les télomères, et assure leur immortalité ¹²⁴. D'autre part, l'augmentation du système vasculaire par angiogenèse permet de favoriser l'arrivée d'oxygène et de nutriments et d'éliminer les éventuels déchets toxiques produits par les cellules tumorales ¹²⁵. Enfin, l'évolution de la pathologie vers un stade malin est souvent corrélée avec l'invasion locale et la présence de métastases à distance du site primaire initiateur. Dans ce contexte, la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT : Epithelial–Mesenchymal Transition) caractérisée notamment par une perte des molécules d'adhésion aux cellules et à la matrice extracellulaire a été largement mise en cause ces dernières décennies ^{126–128}.

En 2011, une mise à jour des six « hallmarks » intégra la contribution indissociable du microenvironnement tumoral au développement d'un cancer ¹²⁹. Ainsi, les concepts de reprogrammation du métabolisme énergétique ¹³⁰ et d'échappement à la destruction immunitaire ont été ajoutés à la description des cancers. Cette dernière caractéristique parût essentielle au vu des nombreux travaux sur la théorie de la surveillance immunitaire et le concept d'immunoediting qui seront développés dans les paragraphes suivant ¹³¹. Il est important de noter que ces 8 caractéristiques sont extrêmement interconnectées et témoignent d'une dimension complexe et non linéaire ¹²⁹.

L'instabilité génétique et l'inflammation chronique sont les deux phénomènes piliers de la progression d'un état normal vers un état néoplasique à travers les 8 étapes citées précédemment. Des mutations, réarrangements chromosomiques, modifications épigénétiques sont des altérations successives pouvant intervenir dans le génome des cellules et leur confèrent un avantage sélectif ¹³². D'autre part, une inflammation est mise en place lors de l'apparition de lésions pré-tumorales et tumorales afin de contrôler sa propagation ^{133,134}. Paradoxalement, il a été montré qu'une inflammation chronique va jouer un rôle opposé et promeut la tumorigenèse ¹³⁵.

Certaines de ces 8 caractéristiques sont favorables à la réplication des virus dans les cellules tumorales et peuvent être utilisées par l'immunothérapie oncolytique. Plusieurs OV ont été génétiquement modifiés pour répliquer uniquement dans les cellules en division. La prolifération intensive des cellules tumorales est donc idéale à leur réplication ^{136 137}. Lors d'une infection virale, l'induction de l'apoptose peut être un des principaux mécanismes de défenses cellulaires pour stopper le virus. Par conséquent, l'acquisition de résistance à l'apoptose par les cellules tumorales est favorable à la progression des OV ¹³⁸. Les nouveaux virions formés dans la cellule hôte sont ensuite libérés dans l'environnement tumoral par induction d'une nécrose des cellules tumorales et peuvent se propager dans la tumeur. La néo-vascularisation augmentée dans la tumeur facilite probablement l'accès des OV sur le site tumoral. En effet, il a été montré que l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention) provoqué par la déstructuration du réseau vasculaire tumoral favorise l'accumulation de certains agents thérapeutiques ^{139,140}. Le métabolisme particulier des cellules tumorales peut aussi être exploité en immunothérapie oncolytique notamment par l'expression anormale d'enzymes impliquées dans la réplication du génome viral ^{136 137}. D'autre part, l'échappement des cellules tumorales en instaurant notamment un environnement immunosuppresseur peut faire de la tumeur un site privilégié pour la réplication virale.

Enfin, certaines voies de signalisation altérées dans les tumeurs telles que la réponse interféron de type I (IFN I) sont impliquées dans plusieurs de ces 8 caractéristiques. En effet, la réponse IFN I, si elle s'active dans les cellules tumorales, peut ralentir la prolifération, le métabolisme, la synthèse protéique et alerter le système immunitaire. De par ses fonctions, la voie IFN I peut donc perturber le développement tumoral et elle est par conséquent souvent altérée dans les cellules cancéreuses. Ainsi, l'utilisation d'OV sensibles à la voie IFN I permet

une réplication optimale dans les cellules tumorales déficientes pour cette voie et une progression virale bloquée par la réponse IFN I dans les cellules saines ¹⁴¹.

B. Concepts de l'immunosurveillance à l'immunoediting des cancers

La première hypothèse de l'implication du système immunitaire dans le développement néoplasique a été posée en 1909 par le Dr. P Ehrlich. Faute d'outils et de connaissances, aucune preuve expérimentale ne put être apportée pour confirmer leur postulat. Le concept d'immunosurveillance fut suggéré au début des années 50 par les Dr. Thomas et Burnet qui supposèrent que les néo-antigènes produits par la tumeur induisent une réponse immunitaire contre le cancer ¹⁴². La première preuve d'une immunisation intradermique de souris contre un sarcome fut observée en 1953 par le Dr. Gross ¹⁴³. De nombreuses études ont suivi confirmant ou infirmant cette théorie, mais il a fallu attendre les années 2000 pour obtenir une preuve définitive de l'importance du système immunitaire dans le contrôle des cellules tumorales et le maintien de l'homéostasie tissulaire. En effet, l'équipe du Dr. Schreiber utilisa des souris immunodéficientes *RAG2*^{-/-} (Recombinase Activating Gene-2), indispensable à la fonction des LT, LB et T Natural Killer (NKT) et à la signalisation de l'IFN- γ . Les souris *RAG2*^{-/-} développèrent des tumeurs spontanées ou chimiquement induites plus tôt et avec une fréquence supérieure que les souris de type sauvage (WT : Wild Type). Ils démontrèrent ainsi le rôle antitumoral des lymphocytes cytotoxiques et la fonction régulatrice de l'IFN- γ ¹⁴⁴.

D'autre part, la même équipe réalisa des expériences de transplantations de cellules tumorales de sarcome chimiquement induites provenant d'animaux immunocompétents ou immunodéficients (*RAG2*^{-/-}). Les deux types de tumeurs ont proliféré chez 100% des souris *RAG2*^{-/-}. A l'inverse, les transplantations chez les souris WT étaient de 100% pour les tumeurs provenant initialement de souris WT contre 40% pour les tumeurs provenant de souris *RAG2*^{-/-}. Ces observations suggéraient que le système immunitaire devient moins puissant au cours du temps face à la progression tumorale ¹⁴⁴. C'est ainsi que le concept d'immunosurveillance a été revisité par celui de l'immunoediting du cancer également connu sous le nom de « théorie des 3E » pour Élimination, Équilibre et Échappement (Figure 5) ¹⁴⁵.

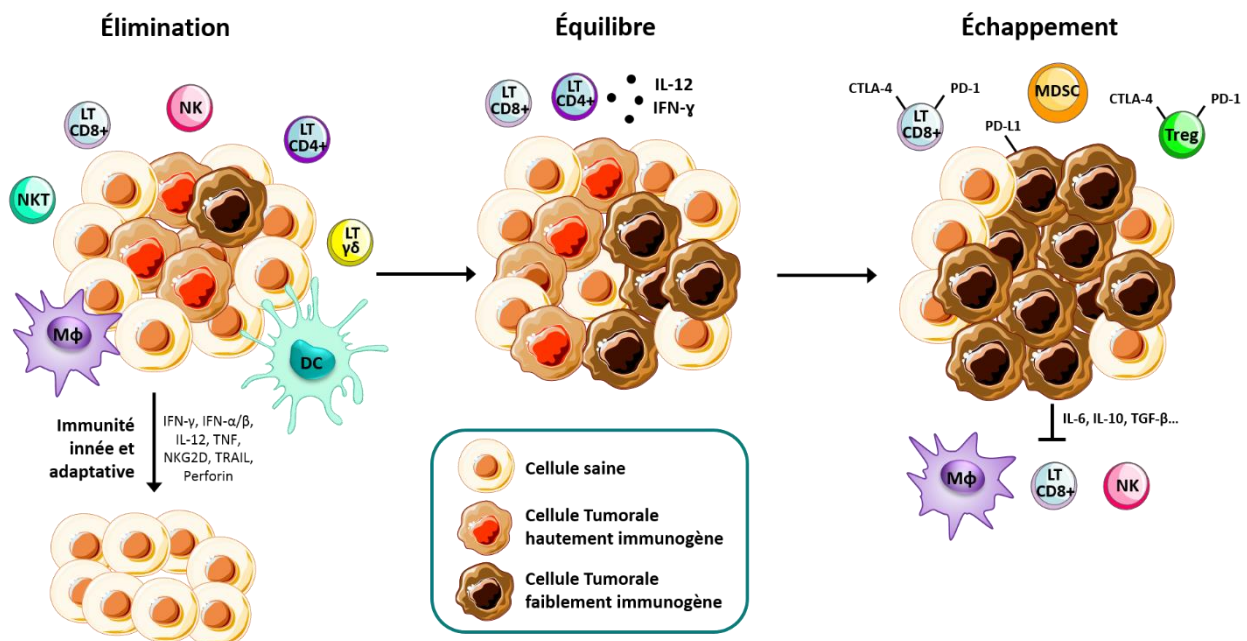


Figure 5. Concept d'immunoediting du cancer. Adapté de Schreiber et al, 2011, Science, « Cancer Immunoeediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion ». ¹⁴⁶

La première phase correspond à la surveillance immunitaire active qui conduit à l'éradication des lésions pré-tumorales. Les cellules immunitaires innées vont agir de concert pour induire une réponse adaptative des LT CD4+ et CD8+ antitumorale. La production et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires participent au recrutement et à l'activation des cellules immunitaires.

Dans un second temps, la pression constante du système immunitaire pour éliminer efficacement la tumeur va paradoxalement participer à la sélection Darwinienne de variants moins immunogènes, il s'agit alors de la phase dite d'équilibre. Ainsi, le système immunitaire est suffisant pour maîtriser la progression tumorale mais pas pour l'éradiquer totalement.

Finalement, seuls quelques variants tumoraux vont échapper à la surveillance immunitaire grâce aux avantages sélectifs acquis lors de la phase d'équilibre ¹⁴⁵. De nombreux mécanismes participent à l'échappement tumoral et à l'établissement d'un environnement immunosuppresseur tels que l'expression d'inhibiteurs de point de contrôle immunitaire (PD-L1), l'altération de la capacité de présentation des antigènes de tumeur au LT en raison de la perte de molécules du CMH, l'absence de production de cytokines immunostimulatrices telles que les IFN I et la production de cytokines immunosuppressives. De plus, la tumeur va recruter des cellules immunitaires suppressives telles que les Treg et les cellules myéloïdes suppressives (MDSC : Myeloid-Derived Suppressor Cells) composées de macrophages de type

M2 et de neutrophiles de type N2 nécessaire à l'inhibition de les réponses antitumorales^{145,147}.

L'immunothérapie oncolytique tire avantage de cet environnement immunosuppresseur de la tumeur qui est favorable à la réplication des OV et donc à la lyse des cellules tumorales. De plus, les signaux de dangers et les antigènes tumoraux libérés par les cellules tumorales mortes vont modifier ce microenvironnement immunosuppresseur et le rendre plus favorable à la réponse immunitaire antitumorale.

C. Réponse immunitaire antitumorale et l'immunité oncolytique

Il y a quelques années, l'oncolyse était décrite comme étant la seule propriété antitumorale associée aux OV. L'équipe de Mastrangelo a cependant démontré une régression des métastases chez des patients atteints de mélanome cutané dans les régions injectées par un OV mais aussi de celles situées à distance des sites d'injections. Leurs résultats suggéraient que les OV peuvent induire une immunité antitumorale systémique¹⁴⁸. Plus tard, notre équipe et d'autres ont montré que l'oncolyse induite par les OV est très immunogène et provoque le relargage de signaux de danger tels que les DAMP (Damage-Associated Molecular Pattern), PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern), des antigènes viraux et tumoraux participant à la réponse immunitaire dirigée contre la tumeur^{149,150}. L'implication des OV dans l'activation d'une réponse immunitaire antitumorale est maintenant largement admise par la communauté scientifique. Le terme virothérapie a d'ailleurs été remplacé récemment par immunothérapie oncolytique afin de prendre en compte cet aspect important (Oncolytic Virus Conference 2016, Boston).

Les OV possèdent donc un double mécanisme d'action avec d'une part une lyse tumorale directe et locale conduisant à la régression tumorale et d'autre part à l'activation du système immunitaire inné et adaptatif qui va aussi participer à l'élimination des cellules cancéreuses et à la prévention d'éventuelles récurrences.

1) Réponse immunitaire antitumorale

a) Théorie du danger

La « théorie du soi et du non soi », c'est-à-dire la réaction immunitaire déclenchée systématiquement en présence d'une entité génétiquement étrangère, a dominé le monde de l'immunologie pendant des années. En 1994, Dr. P Matzinger proposa une nouvelle hypothèse appelée « théorie du danger » selon laquelle le système immunitaire doit recevoir des signaux de danger émis par les cellules lorsqu'elles subissent des dégâts, par exemple lors d'infections par des agents pathogènes comme les virus. Ainsi, en absence de signaux de dangers, certains constituants du non-soi peuvent être tolérés par l'organisme. C'est le cas notamment des fœtus chez la mère ou des bactéries commensales dans l'intestin. A l'inverse, des composants du soi peuvent être la cible d'une réponse immunitaire dans des conditions de stress cellulaires, tel que le développement tumoral ou les maladies auto-immunes ^{151,152}.

b) Mort cellulaire immunogène

Plusieurs formes de morts cellulaires immunogènes (ICD, Immunogenic Cell Death) ont été décrites ^{151,152}. La nécrose est une mort non programmée due à un traumatisme de la cellule caractérisée par la rupture de la membrane plasmique. La pyroptose est une mort programmée associée à l'activation de l'inflammasome qui conduit à la production d'IL-1 β . La nécroptose est une forme de nécrose programmée très inflammatoire, qui est notamment induite par des cytokines telles que le TNF ou par la stimulation des « Toll-Like Receptor » (TLR). Enfin, l'apoptose est classiquement considérée comme non immunogène mais peut le devenir en cas de stress ou de dommages causés par un pathogène, on parle alors d'apoptose immunogène.

Lors d'une ICD, les cellules émettent des signaux dangers qui sont

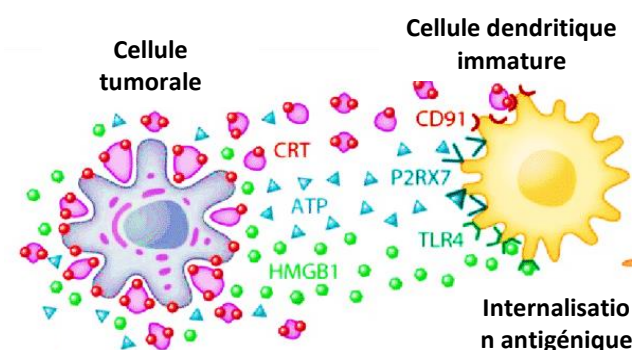


Figure 6. Mort immunogène de cellules tumorales. Adapté de Kroemer et al, 2013, *Annu Rev Immunol*, « Immunogenic cell death in cancer therapy » ¹⁵³. Suite à un stress tel que certains traitements chimiothérapeutiques, les cellules cancéreuses exposent à leur surface la calréticuline, libèrent de l'ATP et de l'HMGB1 reconnu par leur récepteur respectivement sur les DC.

appelé motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMP). Les DAMP associés à l'ICD les mieux caractérisés sont la calréticuline, HMGB1 et l'ATP (Figure 6) D'autre part, en cas d'infection par un agent pathogène, des motifs moléculaires associés aux pathogènes peuvent aussi être reconnus comme des signaux de danger (PAMP) ^{153,154}. Un grand nombre d'études ont montré que certains agents anti-tumoraux tels que les chimiothérapies les irradiations et certains virus oncolytiques induisent une forte ICD ^{153,155}.

c) Initiation de la réponse immunitaire

En absence de pathogènes ou de signaux de danger, les cellules dendritiques (DC : dendritic cell) sont à l'état immature dans tout l'organisme et exercent un rôle de sentinelles. Elles criblent constamment leur environnement et internalisent les antigènes (Ag) du « soi » rencontrés, les transforment en peptide et les présentent aux LT ¹⁵⁶. Les LT capables de reconnaître un Ag en absence de danger subissent alors l'apoptose, l'anergie ou une différenciation en LT régulateurs. Ce phénomène s'appelle la tolérance périphérique ¹⁵⁷⁻¹⁵⁹.

Dans des conditions pathologiques, les PAMP et les DAMP vont être reconnus par les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR : Pattern Recognition Receptors) en surface des cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules dendritiques. Les DC peuvent alors internaliser des Ag provenant des cellules mortes et des pathogènes responsables de l'inflammation ^{160,161}. L'inflammation locale va induire leur maturation qui se caractérise par une augmentation des molécules CD83, de co-stimulation, d'adhésion, des récepteurs de chimiokines, d'une sécrétion de diverses cytokines et d'une diminution de l'activité phagocytaire. Les DC perdent aussi leurs récepteurs de cytokines inflammatoires qui les maintiennent dans les tissus périphériques et leur potentiel migratoire augmente ce qui leur permettent de se rediriger vers les organes lymphoïdes secondaires ¹⁶²⁻¹⁶⁵.

Les DC vont alors initier la réponse immunitaire adaptative effectrice médiée par les lymphocytes T et les lymphocytes B en présentant des peptides issus d'antigènes (Ag) internalisés en périphérie par l'intermédiaire des molécules du complexe d'histocompatibilité (CMH).

Les molécules du complexe d'histocompatibilité de classe I (CMH) présentes dans toutes les cellules nucléées permettent la présentation de peptides issus d'antigènes endogènes et dans certains cas exogènes ¹⁶⁶ (Figure 7). Les antigènes présents dans le

cytoplasme peuvent être découpés en peptides par le protéasome et sont ensuite transportés par les protéines associées au transport (TAP : Transporter Associated with antigen Processing) dans le réticulum endoplasmique où ils vont se fixer sur les molécules HLA de classe I. Les complexes HLA I/peptide (HLA : Human Leukocyte Antigen) ainsi formés sont ensuite transportés à la surface des cellules où ils peuvent être reconnus par des LT CD8+, notamment lors de leur phase effectrice. Les cellules présentatrices d'antigènes (APC : Antigen-Presenting Cell) comme les DC ont la capacité de présenter des antigènes exogènes par les molécules du CMH de classe I, un phénomène nommé présentation croisée qui est important dans la tolérance et l'induction des réponses T CD8+ cytotoxiques^{156,166}. L'antigène est alors internalisé dans le compartiment endo-lysosomal et rejoint la voie endogène de présentation en étant transporté dans le cytoplasme. L'antigène peut aussi être digéré dans la voie endosomale et les peptides ainsi générés se fixent alors à des molécules CMH I recyclées.

Les molécules du CMH de classe II sont principalement exprimées par des cellules immunitaires, notamment les APC. Leur expression peut être induite dans les cellules non-immunitaires par des cytokines comme l'interféron-gamma (IFN- γ). Les CMH II permettent la présentation de peptides issus d'antigènes exogènes aux LT CD4+¹⁶⁶ (Figure 7). Une fois activés, les LT CD4+ vont orienter et promouvoir la réponse immunitaire. L'antigène est capturé par les APC et va être dégradé en peptide dans la voie endo-lysosomale par des protéases comme les cathépsines dont l'activité est dépendante du pH. Les molécules CMH II formées dans la membrane du réticulum endoplasmique sont associées à la chaîne invariante (Chaîne Ii) qui bloque le sillon peptidique et va diriger les CMH II vers le compartiment endo-lysosomal. Dans les compartiments acides, la chaîne invariante est clivée laissant le peptide CLIP dans le sillon peptidique. Le peptide CLIP est ensuite remplacé par les peptides générés à partir de l'antigène avec l'aide de HLA-DM. Les complexes CMH II/peptide ainsi formés sont transportés à la surface où ils peuvent être reconnus par des lymphocytes T CD4+. Des antigènes endogènes, notamment cytoplasmique, sont aussi présentés par les molécules HLA de classe II^{167,168} (Figure 7). Ces antigènes peuvent rejoindre le compartiment endo-lysosomal soit par autophagie, soit en étant libéré, notamment lors de la mort cellulaire et rejoindre la voie classique de présentation CMH II des antigènes exogènes. Dans certains cancers, comme le mélanome, les cellules tumorales peuvent exprimer des molécules CMH II et présenter des antigènes tumoraux cytoplasmiques, comme NY-ESO-1, à des lymphocytes T CD4+¹⁶⁹.

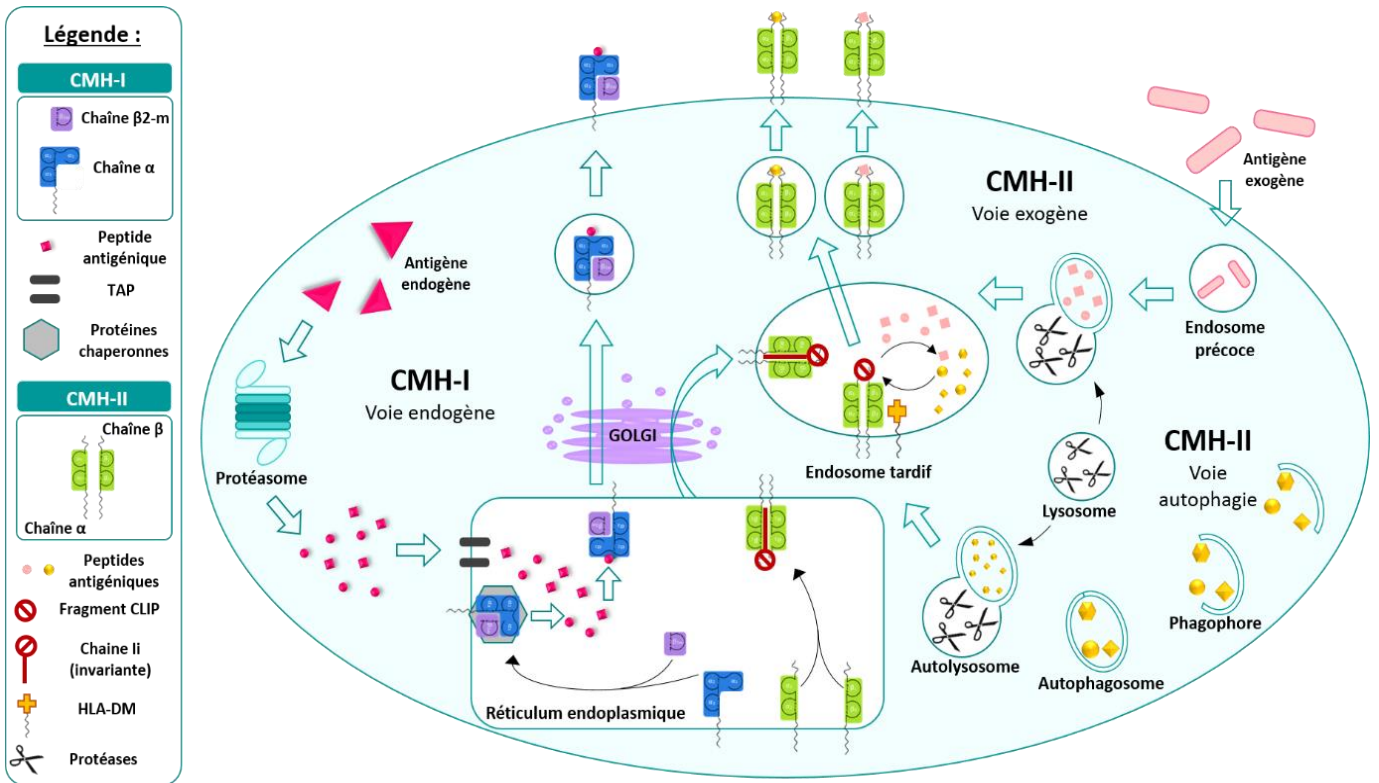


Figure 7. Voie de présentation des CMH de classe I et II. Adapté du site cours-pharmacie.com.

Lorsqu'un lymphocyte T naïf reconnaît un antigène sous la forme d'un complexe HLA/peptide à la surface d'une DC mature, une synapse immunologique se forme. Il en résulte une accumulation de récepteurs de cellules T (TCR : T Cell Receptor) interagissant avec les complexes CMH/peptide présentés par les DC ^{171,172}. Cette interaction est renforcée par les corécepteurs CD4 et CD8 et d'autres molécules d'adhésion et correspond au signal n°1 nécessaire à l'activation des LT naïfs. Le signal n°2 est apporté par les molécules de co-stimulation CD80 et CD86 (ou B7-1 et B7-2) avec le récepteur CD28 exprimé par les LT naïfs. Cette co-stimulation peut être immunosuppressive si les molécules de co-stimulation se lient à d'autres

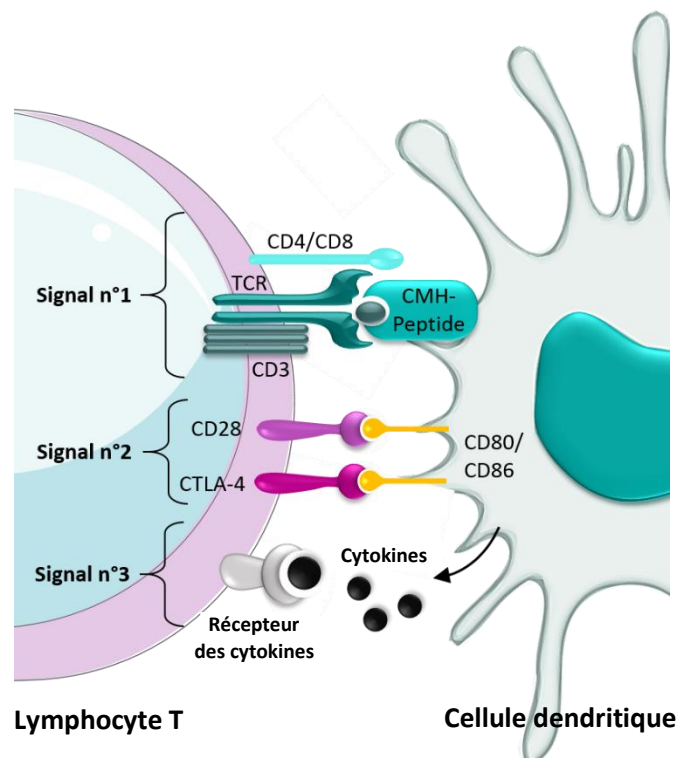


Figure 8. Synapse immunologique formée lors de l'activation des lymphocytes T. Adapté de Sharma et al, 2011, Nat Rev Cancer, « Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit : recent successes and next steps » ¹⁷⁰.

de la famille CD28 : PD-1, TIGIT et CTLA-4. Le signal n°3 est délivré par des cytokines produites par les DC et les LT notamment les LT CD4+ helper ¹⁷¹⁻¹⁷³ (Figure 8).

Les DC matures vont orienter la réponse immunitaire en fonction des signaux reçus du microenvironnement, notamment en influant sur la différenciation des LT CD4+ ¹⁷⁴. Ainsi, elles peuvent induire une réponse immunitaire cellulaire médiée par les LT CD8+ cytotoxiques en différenciant les LT CD4+ auxiliaires vers un profil Th1 (Th : T helper). Une différenciation des LT CD4+ en profil Th2 promeut une réponse immunitaire humorale médiée par les lymphocytes B et leur production d'anticorps. Enfin, les LT CD4+ peuvent aussi se différencier vers un profil Th17 plutôt associé à l'inflammation, vers un profil régulateur associé à l'immunosuppression ou vers un profil cytotoxique ^{175,176}.

d) Activités cytotoxiques lors de la phase effectrice antitumorale

L'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8+ (CTL CD8+) et CD4+ (CTL CD4+) est basée sur la reconnaissance spécifique du complexe CMH/peptide chez les cellules hôtes cibles dans un mécanisme contact-dépendant. Les LT CD4+ ont longtemps été cloisonnés à leur rôle auxiliaire, mais plusieurs rapports ont établi leurs fonctions complémentaires aux CTL CD8+ dans l'immunité antivirale, antitumorale et lors des réponses inflammatoires chroniques (maladies auto-immunes) ¹⁷⁷. Les CTL activent la mort cellulaire par apoptose de la cellule cible grâce à la mobilisation de leurs granules cytotoxiques qui fusionnent à la membrane cellulaire au niveau de la synapse immunologique formée lors du contact. Le contenu des granules, comprenant de la perforine et du granzyme B, est déversé dans la cellule hôte ^{174,178}. La perforine est une protéine cytolytique qui s'insère dans la membrane plasmique et forme un canal nécessaire à l'entrée du granzyme B, une sérine protéase qui dégrade les protéines de la cellule cible ¹⁷⁹. Parallèlement, l'implication du TCR des LT CD8+ dans la synapse entraîne la sécrétion des protéines FasL et du TNF- α qui se lient à leur récepteur Fas (CD95) et TNFR1/2, respectivement, et déclenchent aussi l'apoptose ^{174,177,178}. Enfin, Les DC peuvent aussi acquérir des propriétés cytotoxiques basées principalement sur l'induction de l'apoptose par la protéine TRAIL ¹⁸⁰⁻¹⁸².

De nombreuses études ont démontré la valeur prédictive d'une infiltration de LT CD8+ et CD4+ (TIL : Tumor-Infiltrating Lymphocytes) dans la tumeur concernant la survie des patients. Ce constat a été effectué dans le cancer du sein ¹⁸³, du colorectal ¹⁸⁴, du rein ¹⁸⁵, de

l'ovaire ¹⁸⁶ et dans le mélanome ¹⁸⁷. Parmi les antigènes (Ag) tumoraux, 3 types ont le potentiel d'induire des réponses immunitaires strictement spécifiques de la tumeur ; les Ag issus de virus, les Ag mutés (KRAS : V-Ki-Ras2 Kirsten Rat Sarcoma 2 Viral Oncogene Homolog, NRAS : Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog etc.) et les Ag provenant de souche germinale (ou CTA : Cancer Testis Antigens). A l'inverse, les antigènes issus de différenciation (tyrosinase, Melan-A/MART-1 : Melanoma-associated antigen recognized by T cells etc.) ou d'une surexpression tumorale (RAGE-1, MUC1 : Mucin 1 etc.) présentent une faible spécificité ¹⁸⁸ (Figure 9).

Les Ag issus de la lignée germinale du cancer (CTA) tel que NY-ESO-1 (New York Esophageal Squamous Cell Carcinoma 1) sont exprimés dans une grande variété de cancers et sont absents des tissus sains exceptés les cellules germinales des testicules et du trophoblastes qui ne possèdent pas de molécules CMH-I ¹⁸⁹. NY-ESO-1 a été découvert chez un patient atteint d'un cancer de l'œsophage qui a développé une réponse anticorps spontanée spécifique contre cet Ag de tumeur ^{190,191}. Son expression a ensuite été mise en évidence dans 40% des mélanomes, 25% des cancers du poumon non à petites cellules et de manière remarquable dans 80% des sarcomes synoviaux ¹⁹². Récemment, l'équipe des Dr. C Münz et M Gannagé, en collaboration avec notre équipe, a décrit comment les cellules tumorales de mélanome présentent l'antigène NY-ESO-1 par les molécules HLA de classe II ¹⁹³. Cette présentation a lieu suite au transfert intercellulaire de l'Ag NY-ESO-1 qui atteint la voie endo-lysosomale d'un apprêtement classique par la voie du CMH-II.

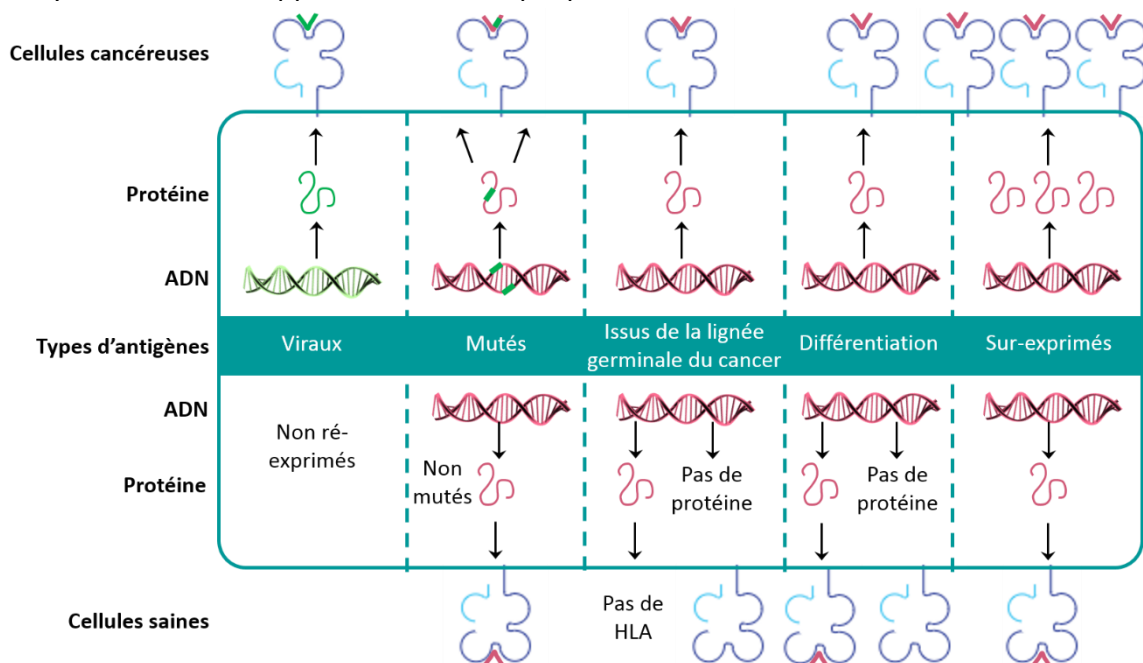


Figure 9. Différentes classes d'antigènes de tumeur. Adapté de Vigneron et al, 2015, Biomed Res Int, « Human tumor antigens and cancer immunotherapy » ¹⁹⁴.

2) Virus oncolytiques et réponse immunitaire antitumorale

La particularité la plus fondamentale de cette thérapie est la capacité des OV à cibler sélectivement les cellules tumorales sans nuire aux tissus sains. L'implication du système immunitaire est indispensable à leur effet thérapeutique bénéfique. En effet, les propriétés lytiques et immunogènes des OV ont pour conséquence de briser la tolérance établie dans le microenvironnement du cancer et de stimuler l'immunité antitumorale.

La mort cellulaire immunogène induite par les OV permet la libération d'antigènes tumoraux (TAA : Tumor Associated Antigen) et des deux types de signaux de danger, PAMP viraux et DAMP. Les caractéristiques typiques de l'ICD y compris l'expression en surface de la calréticuline et le relargage d'ATP et d'HMGB1 ont été retrouvées lors de l'infection par plusieurs OV dont le MV, le Coxsackie B3, un adénovirus exprimant CD40-ligand et le HSV-1^{149,195-198}.

L'équipe du Dr. M Grégoire a été l'une des premières équipes à montrer qu'un OV, le virus de la rougeole atténué (MV : Measles virus), induit la mort immunogène des cellules cancéreuses et entraîne une réponse immunitaire spécifique de la tumeur (Figure 10)¹⁴⁹. En effet, des cellules de MPM lysées par le MV est capable d'activer fortement les cellules dendritiques myéloïdes (mDC : myeloid dendritic cells), tandis que ces mêmes cellules tumorales tuées par irradiation UV ne le sont pas. Cette maturation est caractérisée par l'induction d'expression de CD80, CD86, CD40 et CD83 et par la production de cytokines pro-inflammatoires (l'IL-6, l'IL-1 β , l'IFN- α , l'IL-12 et le TNF- α). Les DC sont alors capables d'internaliser des TAA tels que la mésothéline devenue accessible par la lyse virale, et d'initier une réponse lymphocytaire T CD8+ cytotoxique contre cet antigène¹⁴⁹.

Ces travaux ont ensuite été confirmés par l'équipe du Dr. A Melcher qui a aussi démontré que les cellules tumorales lysées par le MV libèrent du HMGB1, des IFN I et III, de l'IL-6, de l'IL-8 et du RANTES (CCL5)⁴⁰⁶. Ainsi, l'inflammation locale déclenchée par les OV inverse la situation tolérogène en transformant une tumeur dite « cold » avec un environnement immunosuppresseur en tumeur dite « hot » avec la libération conséquente de cytokines propice à l'attraction et la fonction des effecteurs immunitaires¹⁹⁹.

Notre équipe a aussi montré que le MV active les DC plasmacytoides (pDC : mDC : myeloid dendritic cells), un autre type de DC spécialisées dans l'induction des réponses immunitaires antivirales par la production de larges quantités d'IFN I¹⁵⁰. En effet, les cellules

tumorales infectées entraînent la maturation des pDC notamment par la présence du génome viral (ARN simple brin) considéré comme un PAMP et reconnu par le récepteur TLR7. Les pDC produisent alors de forte quantité d'IFN- α et deviennent capables de présenter un peptide issu de l'antigène tumoral NY-ESO-1 par les molécules HLA (Human Leukocyte Antigen) de classe I et d'activer un clone de LT CD8+ spécifique de cet antigène.

Récemment, les travaux menés par le Dr. C Achard au sein de notre équipe ont évalué l'acquisition de marqueurs de cytotoxicité des pDC et mDC induits par contact au MV. Ainsi, l'expression de TRAIL (Tumor-Necrosis-Factor Related Apoptosis Inducing Ligand) est dépendante de l'IFN- α chez les mDC et les pDC en réponse au MV. Le granzyme B est sécrété uniquement par les pDC et l'expression de la perforine est absente chez les deux types de DC en réponse au MV. Les fonctions cytotoxiques des DC activées par le MV sont médiées par TRAIL. De plus, le TLR7 et/ou les RLR (RIG-I-Like Receptors), identifiés comme étant les senseurs responsables de la détection du MV par les DC, sont impliqués dans l'expression de l'IFN- α et donc de TRAIL ²⁰⁰.

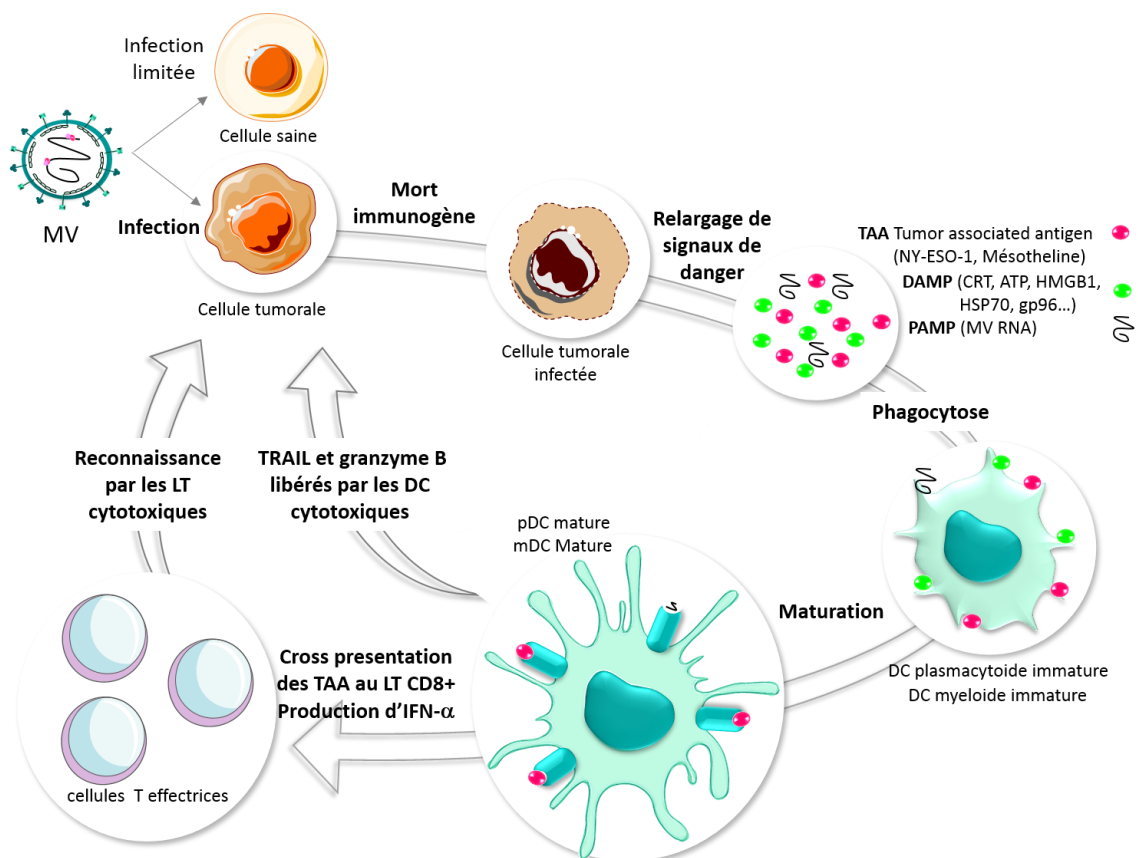


Figure 10. Réponse immunitaire antitumorale induite par le virus de la rougeole oncolytique.

Ces dernières années, les données obtenues dans des essais cliniques d'immunothérapie ont définitivement confirmé l'effet favorable des OV et de l'ICD sur la réponse immunitaire antitumorale. Par exemple, des régressions de métastases à distance de la tumeur où était injecté le virus ont été observées sans évidence de réplication virale dans ces métastases. En effet, il a été rapporté une régression des tumeurs injectées et des métastases à distance des sites injectées par un VV-*GM-CSF* oncolytique chez quatre patients de mélanome cutané sur sept traités ¹⁴⁸. Le suivi viral par le gène rapporteur β -galactosidase a permis de démontrer l'absence du virus au niveau de ces sites à distance suggérant l'implication de l'immunité antitumorale systémique. De plus, les lésions traitées chroniquement présentaient une forte infiltration de LT CD8+ et CD4+, des histiocytes (macrophage du tissu conjonctif) et des éosinophiles. Cette observation a aussi été faite dans un essai clinique de phase II dans le mélanome métastatique traité par un virus herpès simplex de type I modifié appelé T-Vec ²⁰¹. Un dernier exemple est la mise en évidence de réponses lymphocytaires T dirigées contre un antigène de tumeur après traitement dans un essai clinique de phase I dans du cancer de l'ovaire traité par injection intrapéritonéale de MV modifié ²⁰².

Par conséquent de nombreux essais cliniques d'immunothérapie oncolytique sont maintenant réalisés en combinaison avec les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire (CPI). Les premiers résultats avec un virus de l'Herpes modifié (T-Vec) sont prometteurs puisqu'on observe de meilleures réponses avec la combinaison que lorsque le CPI ou l'OV sont utilisés seuls ^{203,204}.

Les OV favorisent donc la réponse immunitaire antitumorale, mais il est important de noter que cet effet adjuvant peut être amélioré en armant les virus avec des agents immunomodulateurs (se référer à la partie II, ingénierie des OV) qui attirent et stimulent les médiateurs et effecteurs de la réponse immunitaire.

III. Virus oncolytiques

Une meilleure compréhension des virus et le développement de nouvelles technologies ont permis de sélectionner ou de modifier génétiquement les virus afin d'améliorer leur spécificité et/ou leur efficacité antitumorale ²⁰⁵. Certaines souches atténuées de virus à ARN présentent souvent un tropisme naturel pour les cellules tumorales tandis que les virus à ADN sont le plus souvent modifiés afin d'obtenir une activité oncolytique optimale. De nombreux essais cliniques et précliniques visant à tester et améliorer l'efficacité des OV ont été réalisés ces dernières décennies. Les OV les plus fréquemment utilisés sont le virus de la rougeole (MV : Measles Virus), le virus de la maladie de newcastle (NDV : Newcastle Disease Virus), le virus de la stomatite vésiculaire (VSV : Vesicular Stomatitis Virus), le poliovirus, le réovirus, l'adénovirus (AdV : Adenovirus), virus de l'herpès simplex virus (HSV : Herpes Simplex Virus), le virus de la vaccine (VV : Vaccinia Virus) ou encore le virus mixomateux (Figure 11) ²⁰⁶.

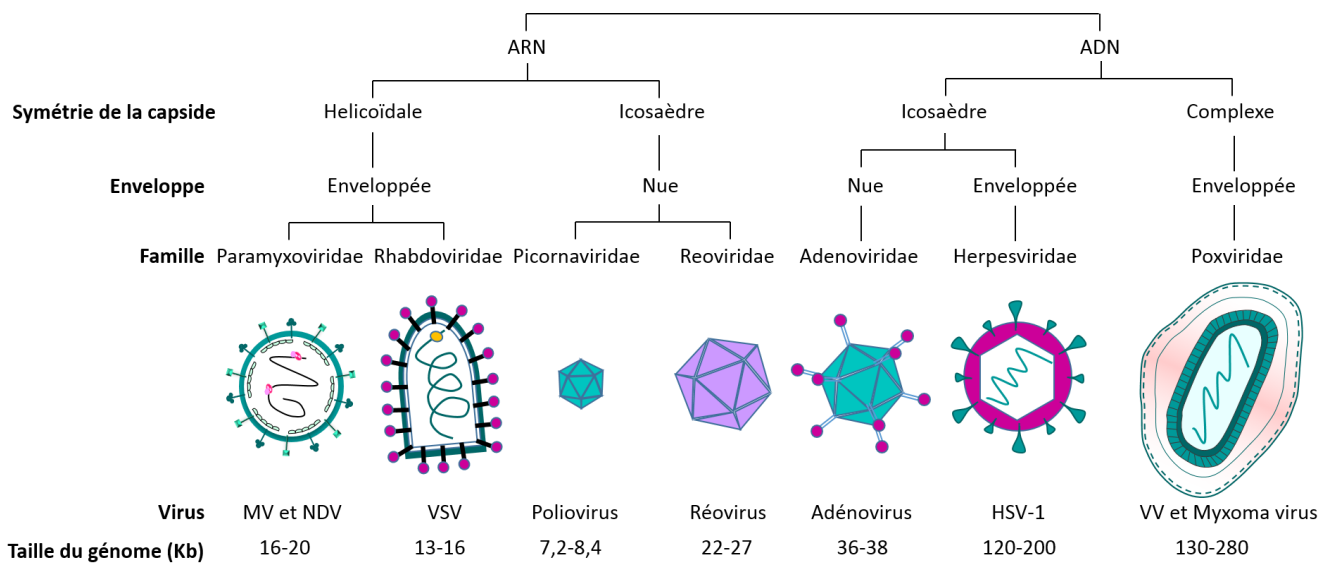


Figure 11. Principaux virus oncolytiques. Adapté de Cattaneo et al., 2008, Nat Rev Microbiol « Reprogrammed viruses as cancer therapeutics: targeted, armed and shielded » ²⁰⁶

HSV1: Herpes Simplex Virus 1; VSV: Vesicular Stomatitis Virus; MV: Measles Virus; NDV: Newcastle Disease Virus.

A. Virus de la rougeole

1) Classification et structure

Le virus de la rougeole (MV) fait partie de la famille *Paramyxoviridae* du genre *Morbillivirus*. Le virion du MV est sphérique et mesure 120 à 1000 nm de diamètre. C'est un virus à ARN simple brin négatif linéaire et non segmenté de 16 kilobases (Kb) comportant seulement 6 gènes qui codent pour 8 protéines. Le génome viral est associé avec la nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P) et l'ARN polymérase ARN dépendante ou protéine large (L) pour former le complexe ribonucléoprotéique (RNP : Ribonucleoprotein) hélicoïdale. La protéine de la matrice (M) est fixée sur le complexe RNP et ils sont recouverts d'une membrane lipidique dérivée de la membrane cellulaire qui contient la protéine de fusion (F) et la protéine hémagglutinine (H) (Figure 12). Les deux autres protéines non structurales V et C sont des facteurs de virulence codés par le même gène que la protéine P. Leur transcription est possible grâce à un processus d'édition de l'ARN et un cadre de lecture alternatif. Ces protéines ont pour fonction première de stopper la réponse immunitaire innée en inhibant les voies interférons²⁰⁹.

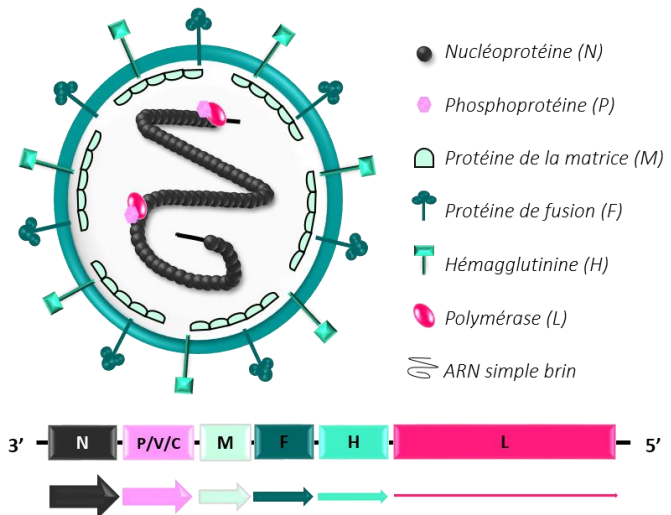


Figure 12. Structure du virus de la rougeole et de l'organisation du génome. Adapté de Aref et al, 2016, *viruses*, « Measles to the Rescue: A Review of Oncolytic Measles Virus » et de Delpout et al, 2012, « Host factors and measles virus replication »^{207,208}

2) Cycle réplcatif

L'entrée du MV dans la cellule hôte est initiée par l'interaction de la protéine virale H avec les récepteurs cellulaires spécifiques. Après fixation, la protéine F va changer de conformation pour permettre la fusion des membranes virale et cellulaire^{210,211}. Le complexe RNP est libéré dans le cytoplasme et l'ARN viral va servir de matrice pour la transcription et la réplication. La transcription des ARNm viraux de 3' vers 5' est sous forme de mécanisme séquentiel, c'est-à-dire que l'ARN polymérase peut se détacher à chaque région intergénique.

La quantité d'ARNm est donc dégressive de 3' vers 5'. La protéine L assure aussi la polyadénylation, la méthylation et le capping des ARNm viraux. Ensuite, la traduction en protéines des ARNm viraux utilise la machinerie cellulaire de l'hôte. Parallèlement, l'ARN viral négatif permet la synthèse complète d'un brin complémentaire positif qui servira de modèle pour la réplication du génome viral ²¹². Une fois la réplication terminée, l'assemblage des protéines structurales nouvellement synthétisées reforme de nouveaux virions matures qui vont bourgeonner à la membrane cellulaire et se propager dans l'organisme. De plus, la formation de syncytia correspondant à la fusion de cellules grâce aux protéines virales H et F formant des cellules géantes multi-nucléées est un autre mécanisme de propagation spécifique au MV et largement utilisé par ce virus ^{210,213}.

3) Pathogénicité et Symptômes

Le MV est le vecteur responsable de la rougeole, pathologie très contagieuse et l'une des principales causes de mortalité infantile dans le monde. En 2016, L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) répertoriait environ 90 000 décès des suites de cette infection. L'hôte naturel de ce virus est l'Homme et aucun réservoir animal n'est connu, bien que certains primates non humains y soient permissifs. Le MV se propage très facilement par les voies aériennes lors de la respiration ou par aérosols ²¹⁴. Il pénètre chez l'hôte par les voies respiratoires et infecte préférentiellement les cellules immunitaires circulantes et l'épithélium localisés dans le tractus respiratoire. Une fois que le virus a atteint les organes lymphoïdes, le MV diffuse dans le sang vers les organes ²¹⁵.

Les premiers symptômes apparaissent 7 à 14 jours après l'exposition au MV. Ces manifestations cliniques sont souvent confondues avec une infection bénigne caractérisée par de la toux, une perte d'appétit, le nez qui coule, une forte fièvre et des taches de Koplik dans la bouche qui peuvent passer inaperçues. Plus tard, l'apparition d'éruptions érythémateuses sur la totalité du corps est le symptôme le plus révélateur de la rougeole. D'autre part, la déplétion importante des cellules de l'immunité due à l'infection conduit à une immunosuppression considérable. Le patient devient alors sensible à toutes infections ou complications de gravité variable (diarrhée, otite, pneumonie, etc.) ²¹⁶. Dans de rares cas, le MV peut envahir le système nerveux central et conduire à des troubles cérébraux souvent mortels (encéphalites) ²¹⁷⁻²¹⁹.

4) Tropisme cellulaire

Les récepteurs d'entrée de la souche sauvage du MV sont la molécule CD150 ou SLAM (Signaling Lymphocytic Activation Molecule) ²²⁰ et la nectine-4 ou PVRL4 (Poliovirus Receptor-Related Protein 4) ^{221,222}.

L'expression de SLAM sur les cellules immunitaires telles que les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes T et B activés, explique l'activité immunosuppressive induite par le MV ²²³⁻²²⁵. Le MV se propage initialement par les voies respiratoires et infecte dans un premier temps les macrophages alvéolaires et les cellules dendritiques résidentes ²²⁶. Les cellules dendritiques infectées acheminent le virus aux ganglions lymphatiques et le transmettent aux lymphocytes T et B activés. Le virus se réplique fortement dans les organes lymphoïdes et se dissémine ensuite vers les organes ²²⁷.

La nectine-4 est quant à elle exprimée sur le côté baso-latéral des cellules épithéliales du poumon. L'infection de ces cellules pourrait permettre au virus d'être ensuite efficacement libéré dans les voies aériennes de l'hôte ^{228,229}.

En plus de son tropisme pour les cellules immunitaires et épithéliales, le MV possède un tropisme neurotrophique. En effet, il a été décrit que ce virus peut se propager de neurones en neurones par micro-fusions non cytolytiques via un récepteur inconnu ²³⁰.

5) Fonction des protéines C et V dans la pathologie

Les protéines C et V sont facteurs de virulence ²³¹ impliqués dans le blocage de la signalisation des IFN I et III ²³². La protéine V interagit avec STAT1, STAT2, STAT3 (STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription) et IRF9 (IRF : Interferon Regulatory Factor) ^{233,234} tandis que la protéine C inhibe la transcription des gènes codant les IFN- α et β ^{235,236}. Elles favorisent donc l'échappement du virus au système immunitaire. Les protéines C et V induisent une réplication virale efficace et rapide mais ne sont pas indispensables à ce processus ^{237,238}. De plus, elles participent au contrôle de la synthèse des ARNm viraux ^{239,240}. La protéine C a aussi été décrite comme jouant un rôle anti-apoptotique important pour ralentir la mort cellulaire ²⁴¹. Enfin, la protéine V diffère de la protéine C par sa capacité à fixer

la protéine NLRP3 (NOD-like Receptor Family, Pyrin Domain Containing 3) impliquée dans l'inflammasome et a pour conséquence une réduction de la sécrétion d'IL-1 β ²⁴².

6) Vaccination

En 1954, le MV fut isolé d'un patient nommé Edmonston par les Dr. Enders et Peebles²⁴³. Ce virus a subi des passages successifs sur des cellules rénales et embryonnaires et de la membrane amniotique humaine et a permis de développer en 1963 le premier vaccin atténué²⁴⁴. Cependant, la première forme atténuée était très réactogène, ce qui a conduit à l'élaboration de nouvelles souches bien plus atténuées par des passages successifs du virus sur différents types cellulaires tels que des embryons et fibroblastes de poulets, des cellules rénales d'hommes, de moutons et de chiens et des cellules diploïdes humaines. Ce processus a notamment permis de générer les souches Edmonston Zagreb, Schwarz, AIK-C, Moraten et Rubéovax. Ces passages successifs ont eu pour résultat de rendre les souches non pathogènes tout en conservant leurs propriétés immunogènes²⁴⁵. Les différences génétiques établies entre les souches sauvage Edmonston et vaccinales ne diffèrent pourtant que de 0,3%²⁴⁶. La mutation N481Y dans la protéine H chez les souches vaccinales leur permet d'utiliser la molécule CD46 comme récepteur d'entrée en plus des récepteurs CD150 et nectine-4²⁴⁷.

Dans les pays développés comme la France, la vaccination contre la rougeole est couplée à celle des oreillons et de la rubéole dans le vaccin ROR (Rougeole-Oreillons-Rubéole) injecté aux enfants à l'âge de 18 mois. L'administration de ce vaccin a eu un impact considérable sur le nombre de cas de rougeole et de décès suite à l'infection avec plus de 4 millions de cas dans le monde en 1980 contre 56000 cas en 2014 selon les chiffres de l'OMS²⁴⁵. L'éradication définitive de la rougeole pourrait être possible si la couverture vaccinale atteignait 95% de la population dans le monde entier. Néanmoins, cette vaccination reste trop faible dans certains pays en développement et la peur non fondée qui a émergé récemment dans les pays occidentaux vis-à-vis des vaccins a marqué l'apparition d'une recrudescence des cas de rougeole²⁴⁸. Depuis peu, de nouvelles stratégies de traitements immédiats ont été mises en place afin de contenir les épidémies. Ce traitement consiste à exposer les patients à des composés antiviraux lors de la période asymptomatique²⁴⁹.

7) Activité oncolytique

a) Sécurité et avantages

La caractéristique la plus intéressante du MV quant à son utilisation en tant que virus oncolytique est sa sécurité. Les patients atteints de cancer étant affaiblis, cet aspect est primordial dans le traitement. Le bilan d'une couverture vaccinale de millions de personnes dans le monde entier au cours de ces cinq dernières décennies a permis d'obtenir une vision sûre de l'utilisation des souches vaccinales de la rougeole ²⁵⁰. Par ailleurs, la reversion du MV sous une forme pathogène est peu probable de par son génome non segmenté stable et à faible risque de mutations et de par les épitopes de la protéine d'enveloppe H hautement conservés ²⁵¹. De plus, la dose administrée en intraveineux lors d'un premier essai clinique contre le myélome multiple était au maximum de 10^{11} TCID₅₀ (50% Tissue Culture Infective Dose) soit 10^8 fois plus qu'une dose vaccinale standard injectée en sous cutané. Malgré cette dose extrêmement élevée, le traitement a été bien toléré avec quelques effets secondaires inférieurs au grade 4 de type syndrome grippale ²⁵². Enfin, il est intéressant de noter que la production à grande échelle de ce virus pour une utilisation en immunothérapie est possible.

b) Tropisme tumoral naturel

Certains OV ont été sélectionnés pour leur capacité à cibler naturellement les cellules cancéreuses plutôt que les cellules normales. C'est le cas de la souche atténuée Schwarz du virus de la rougeole qui utilise le récepteur de surface CD46 pour pénétrer dans les cellules ^{231,253}. Cette protéine transmembranaire joue un rôle de régulateur négatif de la lyse médiée par le complément (CDC : Complement-Dependent Cytotoxicity). En effet, elle a été décrite comme cofacteur pour l'inactivation par clivage des composants du complément C3b et C4b par le facteur sérique I. Elle est exprimée au niveau basal dans toutes les cellules nucléées et les protège de dommages anormaux causés par le complément. De nombreux types de cellules tumorales vont tirer profit de ce mécanisme en surexprimant CD46 à leur surface pour échapper au processus de CDC ²⁵⁴.

Il a été montré que la formation de syncytia, participant à l'effet cytopathique du MV, dépend de la densité d'expression du CD46 en surface des cellules ²⁵⁵. Par ailleurs, notre équipe a montré que le MV infecte des lignées de MPM ainsi que des cellules saines présentes dans l'environnement tumoral quel que soit le niveau d'expression de CD46. Néanmoins, la

réplication virale du MV et donc son activité oncolytique sont bloquées dans les lignées tumorales où la réponse antivirale IFN I est fonctionnelle, alors que les lignées tumorales présentant des défauts de la réponse IFN I sont sensibles à l'activité oncolytique²⁵⁶. Une autre étude sur des lignées cellulaires de sarcome a aussi montré une susceptibilité différentielle à l'infection par MV attribuable à leurs capacités de réponse IFN I²⁵⁷. Ainsi, une réponse IFN I déficiente dans les cellules tumorales permet au MV de se répliquer et la surexpression de CD46 les rend plus sensibles à la propagation du virus que les cellules saines avoisinantes.

Le récepteur épithélial nectin-4 a aussi été identifié pour faciliter l'entrée des souches sauvage et vaccinales du MV et jouer un rôle important dans la dissémination du MV²²⁸. De plus, plusieurs études ont rapporté son expression abondante dans les adénocarcinomes pulmonaires, du côlon, de l'ovaire et du sein²⁵⁸⁻²⁶⁰. Ainsi plusieurs études *in vitro* et *in vivo* chez la souris ont montré que de nombreux types de cancers sont sensibles à l'activité oncolytique du MV (voir la liste des cancers sensibles sur le tableau 1).

B. Virus de la vaccine

1) Classification et structure

Le virus de la vaccine (VV) fait partie de la famille des *Poxviridae* du genre *Orthopoxvirus*. Les *Poxvirus* sont des virus enveloppés en forme de virion ovoïde de 360 nm de long et 250 nm de large environ. Leur génome est composé d'un ADN double brin linéaire de 130-375kb composé de près de 200 gènes codant pour plus de 250 protéines²⁶¹. Le VV infecte un large éventail de vertébrés et d'invertébrés mais son hôte naturel et son origine n'ont pas encore été identifiés. Il est le *Poxvirus* le plus étudié et son absence de pathogénicité lui valut une utilisation importante dans de nombreux domaines. Il est notamment connu pour son utilisation comme vaccin contre le virus de la variole et a permis de l'éradiquer. Il est aussi très utile dans les laboratoires comme vecteur recombinant pour l'expression génique²⁶². Le VV a longtemps été confondu avec le virus du cowpox (CPXV : Cowpox Virus) en raison de son utilisation par Jenner pour vacciner contre la variole mais la distinction de ces deux espèces fut caractérisée en 1939^{263,264}. Lors de la vaccination, de rares effets secondaires peuvent être provoqués par le VV tel que l'encéphalite, le nécrosum de la vaccine, l'eczéma et la myopéricardite vaccinatium avec 1 cas pour environ 1000 à 40000 vaccinations^{265,266}.

Les *Poxvirus* présentent une particularité intéressante qui les distingue des autres virus à ADN puisqu'ils effectuent leur réplication dans le cytoplasme plutôt que dans le noyau. Le cycle réplcatif des *Poxvirus* est complexe mais il est cependant très rapide car la réplication commence quelques heures après l'entrée du virus.

Le VV est composé de deux particules infectieuses, le virus mature intracellulaire (IMV : Intracellular Mature Virus) et le virus extracellulaire enveloppé (EEV : Extracellular Enveloped Virus) qui possède une membrane supplémentaire par rapport à l'IMV. Chacune de ces formes possède des propriétés et des rôles différents dus à la présence de protéines virales distinctes (Figure 13) ²⁶⁷.

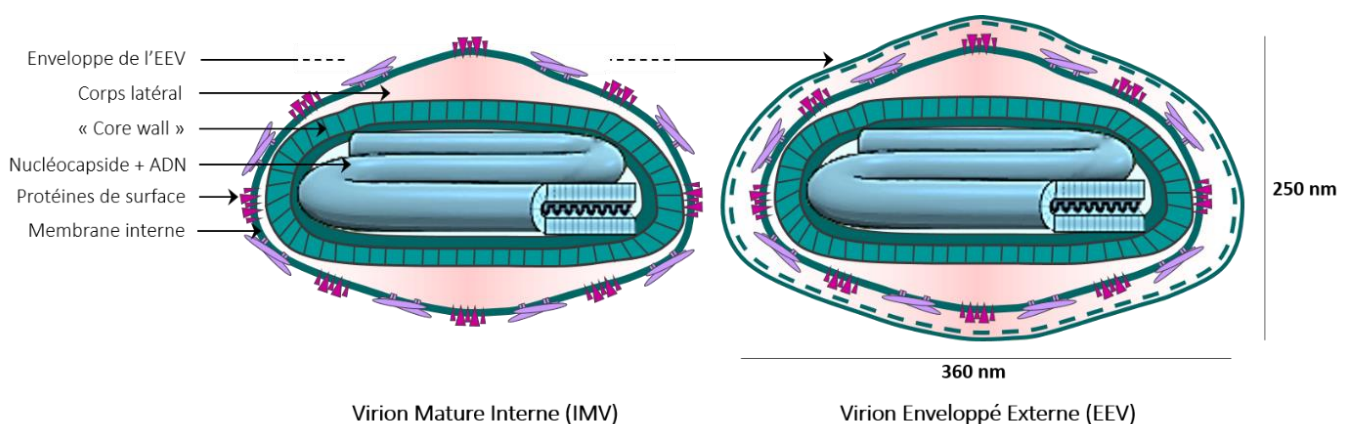


Figure 13. Structure des *Poxviridae*. Adaptée de ViralZone©

2) Cycle réplcatif

L'entrée du VV comporte toujours des points à éclaircir, par exemple les récepteurs d'entrée des deux formes de ce virus n'ont pas encore été déterminés précisément. La forme IMV a été décrite pour se lier aux glycosaminoglycanes ²⁶⁷ de type sulfate d'héparane par la protéine virale A27L lors d'une entrée par endocytose ²⁶⁸. Les protéines virales H3, A26, A27 et D8 peuvent aussi interagir avec des laminines, des intégrines et CD98 lors d'une fusion directe de la membrane virale avec la membrane cellulaire de l'hôte ²⁶⁹. L'entrée de la forme EEV est moins claire. Il a été montré que la fixation de l'EEV perturbe la membrane supérieure et laisse apparaître la membrane de l'IMV qui va alors pouvoir fusionner avec la membrane plasmique cellulaire ²⁷⁰. Ensuite, la réplication et la formation de nouveaux virions de ces deux particules sont identiques. La capsid virale est libérée dans le cytoplasme après l'entrée du virus. Elle contient le génome, des protéines structurales et des enzymes nécessaires pour initier la

phase précoce de transcription. Une centaine d'ARNm sont transcrits précocement puis libérés dans le cytoplasme cellulaire pour être traduits et permettre les étapes de décapsulation, de libération de l'ADN parental et de réplication. La réplication se produit dans le cytoplasme et est suivie des phases de transcription/traduction intermédiaire et tardive permettant notamment de synthétiser des protéines impliquées dans l'assemblage des nouveaux virions. Les virions sphériques ou en forme de croissant deviennent matures en IMV seulement lorsqu'ils captent l'ADN viral. Une partie des particules IMV va rester dans la cellule en attente de sa lyse. D'autres IMV vont devenir des EEV après avoir récupéré une membrane dérivée du réticulum endoplasmique puis elles sont acheminées vers le milieu extracellulaire. Les EEV peuvent aussi prendre la forme de CEV (Cell-associated Enveloped Virus) où le virus enveloppé reste fixé à la surface de la cellule. Les formes EEV et CEV sont impliquées dans la propagation virale. De manière intéressante, les particules CEV ont la capacité d'induire la formation d'actine en surface de la cellule infectée pour les rapprocher des autres cellules avoisinantes. De plus, la présence d'une membrane dérivée de l'hôte les protège du système immunitaire ^{270,271}.

3) Les souches vaccinales et techniques d'atténuation

Différentes origines et techniques d'atténuation ont donné lieu à un grand nombre de souches du virus de la vaccine atténuées permettant leur utilisation comme vaccin, comme vecteur en laboratoire ou en immunothérapie. Le VV étant très immunogène par l'induction d'une forte réponse immunitaire cytotoxique, son utilisation comme vaccin est idéale. On retrouve de nombreuses souches dites de première génération (NYCBH : New York City Board of Health, Wyeth dérivée de NYCBH, Lister, Copenhague, Temple of Heaven, Ankara etc.) et de deuxième génération (dérivée de NYCBH et Lister) qui ont servi à éradiquer la variole. Ces souches ont présenté une faible pathogénicité mais leur profil de sécurité ne fut pas assez satisfaisant, c'est pourquoi deux nouvelles approches ont été mises en place ²⁷².

La première technique consiste à faire évoluer la souche par plusieurs passages successifs sur une culture cellulaire et la deuxième nécessite de modifier le génome d'une souche par génie génétique par l'insertion et/ou la délétion de gènes spécifiques. La souche Ankara modifiée (MVA : Modified Vaccinia Ankara) est la souche la plus connue de celle obtenue par la première approche. Elle a été isolée par plus de 570 passages successifs sur

des cellules embryonnaires de poulets ²⁷³. Ce processus provoque des modifications dans le génome viral le rendant moins pathogène. La souche de MVA résultante a perdu la capacité d'infecter de manière productive les cellules de mammifères et a perdu près de 15% de son génome ²⁷⁴. L'absence de virulence de cette souche a été montrée dans une grande variété d'espèces animales et même dans des modèles immunodéprimés ²⁷⁵⁻²⁷⁷.

La deuxième approche fréquemment utilisée a permis d'obtenir la souche vaccinale NYVAC dérivée de la souche Copenhague (VACV-COP) qui a été séquencée en 1990 par Dr. Paoletti et ses collègues ²⁷⁸. Ainsi, 18 cadres de lecture ouverts (ORF : Open Reading Frames) ont été délétés de manière précise du génome viral. On retrouve notamment des gènes essentiels au métabolisme des nucléotides tels que la thymidine kinase (ORF J2R) et la grande sous-unité de la ribonucléotide réductase (ORF I4L). La perte de l'hémagglutinine (ORF A56R), d'une protéine impliquée dans la virulence de la vaccine (ORF N1L) et d'une protéine liant le facteur 4b du complément (ORF C3L) participe à l'atténuation de cette souche. Ces modifications génétiques ont très fortement réduit la capacité du virus à se répliquer dans les cellules saines tout en conservant une bonne capacité à induire une réponse immunitaire ²⁷⁹.

Cette technique de thérapie génique peut aussi permettre d'insérer des gènes d'intérêt dans le génome du VV qui est non répliatif lorsqu'il est utilisé comme vecteur. L'insertion de molécules co-stimulatrices peut améliorer l'immunogénicité de la souche vaccinale. L'ajout de gènes spécifiques d'autres virus peut cibler une large gamme de maladies infectieuses telles que l'hépatite B, la grippe, le HSV ou le VIH-1 (virus de l'immunodéficience humaine). Enfin, le virus de la vaccine peut aussi servir de vecteur utilisé dans la vaccination contre le cancer ²⁷².

4) Activité oncolytique

a) Sécurité et avantages

Le virus de la vaccine présente de nombreuses propriétés favorables à son utilisation en immunothérapie. Tout d'abord, ce virus présente un tropisme cellulaire très large car il ne possède pas de récepteur d'entrée spécifique ²⁸⁰. Son cycle lytique est court et ne dépend pas de la machinerie cellulaire de l'hôte. Il est donc peu sensible aux changements biologiques cellulaires. La réplication du VV se déroulant dans le cytoplasme de la cellule, le risque d'intégration du génome virale est minime ^{281,282}. De plus, la forme de virion EEV possède une

enveloppe dérivée de l'hôte qui lui permet d'échapper au système immunitaire et d'atteindre les tumeurs via la circulation sanguine lors d'une injection en systémique ^{283,284}. Enfin, tout comme le MV, le VV a montré une grande sécurité lors de son utilisation comme vaccin contre la variole depuis plus d'un siècle avec peu d'effets secondaires rapportés. De plus, lors d'essais cliniques réalisés avec la souche JX-594 dans le carcinome hépatocellulaire la toxicité du virus était limitée ²⁸⁵.

b) Tropisme tumoral redirigé

Certains *Poxvirus* présentent une sélectivité naturelle pour les cellules cancéreuses. C'est le cas par exemple du virus de la myxomatose qui infecte préférentiellement les cellules avec des défauts de la voie interféron de type I fréquemment rencontrés dans les cancers. D'autres *Poxvirus*, tels que le VV, nécessitent des modifications préalables par génie génétique pour obtenir une sélectivité tumorale.

La thymidine kinase (TK) et la ribonucléotide réductase (RR) sont indispensables au métabolisme des nucléotides viraux et leurs gènes sont souvent délétés dans les souches vaccinales. Dans les cellules saines, la TK et la RR, impliquées dans la synthèse et la réparation de l'ADN, sont exprimées de manière transitoire au cours de la phase S. A l'inverse, les cellules tumorales étant en forte division surexpriment constitutivement ces protéines. Les souches vaccinales *TK-RR-* mutées au niveau des gènes *TK* et *RR* présentent donc une réplication optimale dans les cellules tumorales contrairement aux cellules saines ^{136,137}. On retrouve par exemple les souches GLV-1h68 ²⁸⁶ et GLV-1h151 ²⁸⁷ qui ont des mutations au niveau du gène *TK* et du gène *A56R* codant pour l'hémagglutinine. Le JX-594 ou Pexa-vec[®], utilisé en clinique, a le gène *TK* muté et code le GM-CSF humain ²⁸⁸. Enfin, la souche TG6002 de Transgene est délétée des gènes codant la *TK* et la *RR* et est armé avec le gène suicide *FCU1* ²⁸⁹.

L'activation de la voie EGFR est aussi nécessaire à la réplication du VV. En effet, le VV va produire son propre facteur de croissance VGF (Vaccinia virus Growth Factor), homologue de l'EGF qui va induire la prolifération des cellules infectées et de cellules avoisinantes en se liant au récepteur EGFR. Une délétion du gène codant le VGF redirige le virus vers les cellules tumorales qui ont fréquemment la voie EGFR continuellement activée ²⁹⁰. La double délétion *TK* et *VGF* appelée *vDD* est fréquente dans les souches vaccinales du VV. La souche JX-963 possède cette double délétion et exprime le GM-CSF ²⁹¹.

Le VV exprime de nombreux gènes immunomodulateurs tels que la protéine E3L qui inhibe la voie IFN I ²⁹². La délétion d'E3L empêche le VV de se répliquer dans les cellules saines mais reste permissif aux cellules cancéreuses présentant des défauts de réponse IFN I ²⁹³. Enfin la délétion d'inhibiteurs de l'apoptose tels que les serpinines favorise la lyse rapide des cellules tumorales par le VV ²⁹⁴.

C. Virus de la stomatite vésiculaire

Le virus de la stomatite vésiculaire (VSV : Vesicular Stomatitis Virus) appartient à la famille des *Rhabdovirae* du genre *Vesiculovirus*. Il est un virus enveloppé à ARN simple brin négatif et non segmenté. Son génome de 11 kb est composé de 5 gènes codant pour 5 protéines, la nucléocapside (N), la phosphoprotéine (P), la protéine de matrice (M), la glycoprotéine (G), et la large protéine (L) qui présente une activité ARN-polymérase ARN dépendante ²⁹⁵.

Le VSV bénéficie d'un tropisme très large avec une capacité d'infecter un grand nombre d'espèces y compris l'homme et un grand panel de types cellulaires. La transmission du VSV se fait via les arthropodes. Ce virus est pathogène pour les bovins, les chevaux et les porcs mais ne l'est pas pour l'homme. Néanmoins, il peut utiliser l'Homme dans de rares cas et d'autres espèces comme réservoir viral. Les rares infections humaines sont asymptomatiques ou bénignes (symptômes grippaux). Une encéphalite chez un enfant de 3 ans a été le seul cas grave répertorié potentiellement imputable au VSV ²⁹⁶.

A ce jour, le récepteur d'entrée de ce virus n'a pas été identifié avec certitude. Il a été admis pendant des années que l'entrée du VSV se fait via la phosphatidylsérine (PS). Cependant, l'inhibition de cette molécule de surface n'a pas donné lieu à une diminution de l'infection par le VSV ²⁹⁷. Plus tard, des études ont suggéré que les membres de la famille du LDLR (Low Density Lipoprotein Receptor) pourraient être impliqués dans l'entrée du VSV et expliqueraient son large tropisme ²⁹⁸.

La protéine de la matrice (M) a un rôle majeur et très diversifié dans l'infection, le cycle répliatif et l'effet cytopathique du VSV. Le sous-type M1 est impliqué dans l'entrée du virus, l'inhibition de la transcription cellulaire, la perturbation du transport nucléaire des ARNm et elle est capable d'atténuer les réponses inflammatoires. L'implication des sous-types M2 et M3 dans ces différents mécanismes n'est pas clairement définie. Néanmoins, une propriété

commune leur a été attribuée. En effet, la région C-terminale des 3 sous-types participe à l'effet cytopathique du VSV en induisant un arrondissement des cellules suivi de leur lyse^{299–302}.

Le VSV a tout d'abord permis une meilleure compréhension de la virologie générale et la physiologie cellulaire et a été décrit plus tard comme un vecteur vaccinal intéressant. Afin de lutter contre la grippe et la rougeole, l'hémagglutinine des virus influenza et du MV a été inséré dans le génome du VSV (VSV-HA et VSV-MV-H). La vaccination sur des rongeurs a été évaluée et a permis une immunisation efficace^{303,304}. L'insertion de protéines de l'hépatite C (VSV-HCV-C/E1/E2)³⁰⁵, du VIH (VSV-GagEnv)³⁰⁶ et récemment du virus Ebola (VSV-EBOV)³⁰⁷ a donné des résultats intéressants pour la vaccination contre ces différents pathogènes.

En immunothérapie, le VSV présente de nombreux aspects bénéfiques dont une activité oncolytique rapide et puissante, qui ont permis une large utilisation en préclinique. Néanmoins, certains désavantages ont freiné son application en clinique. La propriété neurotrope du VSV a notamment été mise en évidence dans les modèles animaux après répllication virale dans le lobe olfactif et le cervelet, provoquant une encéphalite virale mortelle. Plusieurs approches ont amélioré la sécurité du VSV en abrogeant cette neurotoxicité. On retrouve par exemple la modification de la protéine M soit par délétion ou en remplaçant la méthionine en position 51 par une arginine (Δ M51 et rM51R-M)^{308,309}, des mutations ponctuelles dans la protéine G³¹⁰, l'expression d'IFN- β codée par le VSV^{311–313} ou le re-ciblage spécifique du VSV vers les cellules tumorales^{314,315}.

Le VSV a la capacité d'infecter un grand panel de cellules et son récepteur d'entrée ne lui confère pas de tropisme tumoral particulier. En revanche, l'oncoselectivité de ce virus est basée en grande partie sur la présence d'une réponse IFN I défectueuse dans un grand nombre de cellules cancéreuses^{316–318}. Après répllication, la souche WT induit l'apoptose principalement via la voie intrinsèque tandis que les souches Δ M51 et rM51R-M utilisent majoritairement la voie extrinsèque^{319,320}.

D. Virus de l'herpès simplex

Le virus de l'herpès simplex 1 (HSV-1 : Herpes Simplex Virus-1) appartient à la famille des *Herpesviridae* du genre *Herpesvirus*. C'est un virus à ADN double brin linéaire et monopartite de 152kb entouré d'une capsidie icosaédrique et d'une enveloppe lipidique. Le génome du HSV-1 est complexe avec environ 80 gènes codant pour au moins 84 protéines^{321,322}. L'HSV-1 est pathogène pour l'homme et peut provoquer des symptômes bénins voire asymptomatiques. Le HSV-1 se manifeste dans la majorité des cas par des infections oro-labiale avec l'apparition de vésicules au niveau de la bouche³²³.

L'attachement du virus à la cellule hôte se fait par interaction avec des glycosaminoglycanes de la surface cellulaire tels que la nectine-1, la nectine-2 et le sulfate d'héparane. L'HSV-1 peut alors entreprendre une infection lytique dans les cellules épithéliales ou latentes dans les neurones sensitifs et les ganglions innervés proches de la région infectée. Dans ces conditions, le génome est circulaire³²⁴. Comme la majorité des virus à ADN, le cycle réplcatif de l'HSV-1 se déroule dans le noyau de la cellule infectée. Le virus va prendre le contrôle de la cellule en détournant la fonction des protéines de la machinerie cellulaire, notamment l'ARN polymérase II de l'hôte, pour transcrire la totalité de ses gènes (immédiats, précoces et tardifs).

Plusieurs propriétés dont le cycle naturellement lytique, la capacité à infecter de nombreux types cellulaires, la disponibilité de traitements antiviraux efficaces et la taille de son génome font du HSV-1 un virus oncolytique idéal. Ainsi, un grand nombre d'études précliniques ont permis de créer de nouvelles souches par mutations de gènes non essentiels afin de contrecarrer son pouvoir pathogène et de le rediriger vers un effet oncolytique. Les principales délétions visent les gènes codant pour les protéines ICP6, ICP34.5, ICP47 et la thymidine kinase³²⁵. La délétion des homologues viraux de la thymidine kinase (*TK*) et ribonucléotide réductase (*ICP6*) permet une réplcation sélective dans les cellules tumorales en division. La perte du facteur de neurovirulence ICP34.5 participe à la réduction de la pathogénicité neuronale et favorise aussi la spécificité pour les cellules tumorales^{326,327}. En effet, le HSV-1 *ICP34.5-* se réplique seulement lorsque la protéine PKR (Protein Kinase R) est inactive, défaut retrouvé chez les cellules tumorales³²⁸. Enfin, la perte d'*ICP47* restaure la présentation d'antigènes via le CMH de classe I et favorise par conséquent la réponse immunitaire antitumorale^{325,329}.

L'HSV-1 Talimogene Laherparepvec (T-Vec), premier virus oncolytique commercialisé aux USA et en Europe pour le traitement du mélanome métastatique, est délété pour les gènes *ICP34.5* et *ICP47* et exprime le GM-CSF³³⁰. Les souches G207 et NV1020 actuellement évaluées en clinique portent aussi une délétion d'*ICP34.5*. G207 est également muté pour le gène *ICP6*³³¹. Dans une étude récente, notre équipe a utilisé la souche rQNestin34.5v.1 recombinante pour la protéine fluorescente eGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein), capable d'exprimer la protéine *ICP34.5* sous le contrôle d'un promoteur nestine et délétée pour les gènes *ICP6* et *ICP34.5* endogènes. La nestine a une expression éteinte chez les adultes et régulée à la hausse dans certains cancers³³².

E. Entérovirus de type Echovirus

Les *Echovirus* font partie des entérovirus de la famille des *Picornaviridae* et sont divisés en 32 sérotypes. Leur génome est composé d'un ARN simple brin positif de 7,5kb et contient un seul cadre de lecture ouvert. Une seule poly-protéine traduite est clivée générant quatre protéines structurales et sept protéines non structurales. Le récepteur d'entrée des échovirus est la protéine CD55 ou DAF-3 (decay accelerating factor-3) qui régule la voie du complément à la surface cellulaire³³³.

Les *Echovirus* se transmettent par contamination oro-fécale et sont associés à des troubles divers tels que les maladies respiratoires, cutanées, paralytiques, des diarrhées et la méningite aseptique. Les données sur ce virus oncolytique sont très limitées étant donné qu'il a majoritairement été étudié par des équipes scientifiques en Lettonie. La souche sauvage de sérotype 7, appelée ECHO-7 (Enteric Cytopathogenic Human Orphan virus) ou RIGVIR, a d'ailleurs été approuvée dans ce pays pour une utilisation clinique dans le traitement du mélanome¹¹⁵.

F. Adénovirus

L'adénovirus humain (AdV) est un virus non enveloppé qui appartient à la famille des *Adenoviridae* du genre *Mastadenovirus*. Leur génome est composé d'ADN double brin non-segmenté de 36kb codant pour 35 protéines dont une douzaine de protéines structurales qui forment la capsid virale. Plusieurs récepteurs ont été identifiés comme porte d'entrée de

l'AdV tels que le récepteur CAR (Coxsackie and Adenovirus Receptor), le CD46, l'acide sialique, la glycoprotéine GD1a et la desmogleine-2. De plus, l'intégrine cellulaire αV joue un rôle important dans l'endocytose du virus ^{334,335}. Le cycle de l'AdV est proche de celui de l'HSV-1 avec un cycle répliatif dans le noyau et la transcription de la majorité de ses gènes par l'ARN polymérase II de l'hôte. Ce cycle est plutôt lent puisque l'AdV peut utiliser la cellule hôte comme plateforme de répliation intense avant la libération des virions plusieurs jours post-injection ³³⁵.

Les AdV se divisent en 7 espèces de A à G avec 50 sérotypes et 70 génotypes distincts. Les différentes espèces sont classées en fonction de leur tropisme. Les espèces A, C et E infectent le tractus respiratoire, B et D la conjonctive et F et G le tractus gastro-intestinal. Les différents sérotypes et génotypes sont dissociés selon des critères biochimiques, biologiques et pathologiques. Les AdV sont omniprésents et la plupart des gens rencontrent un ou plusieurs sérotypes/génotypes au cours de leur vie. L'infection par l'AdV est asymptomatique ou bénigne pour les personnes en bonne santé (pharyngites, trachéobronchites, conjonctivites etc.) mais peut entraîner des complications graves telles qu'une pneumonie sévère chez les adultes immunodéprimés ou les jeunes enfants pouvant aller jusqu'au décès ³³⁶.

L'utilisation de l'AdV comme vecteur pour la vaccination ou pour la thérapie génique est l'une des plus étudiée et présente de nombreux avantages de par son tropisme cellulaire variable et la capacité des virions à être maintenus dans la cellule. Le premier AdV utilisé en immunothérapie était la souche Onyx-015 délétée pour l'inactivateur de p53, le gène *E1B-55k*. Ainsi, Onyx-015 était sélectif des cellules tumorales déficientes en p53. Plus tard, la souche H101 a été approuvée en Chine en 2006 pour le traitement du carcinome nasopharyngé ¹¹⁶. Chez ce mutant, le gène codant la protéine E1A est délété au niveau du site de liaison de Rb ($\Delta 24$) qui peut alors séquestrer le facteur de transcription E2F nécessaire à l'induction du cycle cellulaire et de la répliation virale. H101 est donc sélectif des cellules tumorales avec une voie E2F constitutivement activée. Le virus ne peut pas se répliquer dans les cellules saines car E2F est réprimé par RB ³³⁷.

G. Cancers sensibles aux virus oncolytiques

Le potentiel oncolytique des virus de la rougeole, de la vaccine, de la stomatite vésiculaire, de l'herpès, de l'adénovirus et de l'entérovirus a été testé sur un large panel de cancers. Une multitude d'études précliniques prouvent la sensibilité de cancers hématologiques et solides. Dans la majorité des cas, les OV ont tous un ou plusieurs « cancers de prédilection » pour lesquels les études ont été plus nombreuses et poussées et ont conduit à des transferts à la clinique. C'est le cas par exemple du mélanome pour le HSV-1, l'hépatocarcinome pour le VV, le cancer de l'ovaire pour le MV et le carcinome nasopharyngé pour l'adénovirus. Etonnamment, les études qui ont conduit l'entérovirus à être utilisé en clinique et à être approuvé en Lettonie pour le traitement du mélanome ne sont pas disponibles. Un tableau listant les cancers sensibles aux différents OV étudiés au cours de ma thèse est représenté ci-dessous (Tableau 1).

Type de cancer	MV	VV	HSV	VSV	AdV	EV
<i>Adénocarcinome pulmonaire</i>	338–340	341–343	344	345	346	347
<i>Cancer de la prostate</i>	348–350	351,352	353	354	355	
<i>Cancer de la thyroïde</i>	356	357–360	361		362	
<i>Cancer de la vessie</i>		363,364	365	366	367	
<i>Cancer du pancréas</i>	368–371	372	373	374	375	347
<i>Cancer gastrique</i>		376	377		378	379
<i>Cancer squameux de la tête et du cou</i>	380,381	382–385	386	387	388	
<i>Carcinome cervical</i>		389	390	391	392	
<i>Carcinome colorectal</i>	340,393–395	396–399	400	401	402	403
<i>Carcinome hépatocellulaire</i>	394,404–407	408–413	414	415	416	
<i>Carcinome mammaire</i>	395,417–420	421–428	429	430	431	347
<i>Carcinome ovarien</i>	432–438	439–443	444	445	446	447
<i>Carcinome rénal</i>	448	449,450	451		452	
<i>Gliome / glioblastome</i>	453–458	459–462	463	464	465	
<i>Leucémie/Lymphome</i>	466–471	472	473	474	475	
<i>Médulloblastome</i>	476–478		473		479	
<i>Mélanome</i>	198,480–482	289,483,484	485	486	487	347
<i>Mésothéliome malin</i>	149,256,488	286,489,490	491	492	493	
<i>Myélome</i>	494–499	472,500–503		504	505	
<i>Neuroblastome</i>	506		507	508	509	
<i>Ostéosarcome</i>	510			511	512	

Tableau 1. Etudes précliniques *in vitro* et *in vivo* évaluant l'efficacité des virus oncolytiques.

MV : virus de la rougeole ; VV : virus de la vaccine ; VSV : virus de la stomatite vésiculaire ; HSV : virus de l'herpès ; AdV : adénovirus ; EV : entérovirus. Les numéros inscrits dans le tableau sont des références bibliographiques. Remarque : Toutes les études disponibles dans la littérature sont citées pour le MV et le VV. Seulement la première étude pertinente démontrant la sensibilité du cancer aux 4 autres OV est citée.

IV. Ingénieries des virus oncolytiques

Les virus décrits précédemment sont des candidats sérieux pour le traitement du cancer par immunothérapie oncolytique. Afin d'obtenir des souches virales oncolytiques toujours plus puissantes et efficaces, de nombreuses modifications ont été évaluées lors d'études précliniques. Le virus de la rougeole et le virus de la vaccine seront utilisés comme exemple majeur dans ce chapitre afin de décrire les améliorations apportées aux OV. Néanmoins, un tableau répertoriant les modifications les plus importantes réalisées sur les autres virus est d'abord présenté ci-dessous afin d'étayer mon propos (Tableau 2).

	Type de modifications	MV	VV	VSV	HSV	AdV	
Optimiser la spécificité	CD38 (myélome, leucémie)	497	-	-	514	-	
	CD20 (lymphome non hodgkinien)	469	-	-	-	-	
	CD133 (cancer du foie, du colon et glioblastome)	394	-	-	515	-	
	CD80 et CD86 (gliome)	-	-	-	-	516	
	Bispécifique EphA2 et CD3 (adénocarcinome)	-	513	-	-	-	
	Récepteur des folates (cancer de l'ovaire)	433	-	519	-	-	
	IL-13R α 2 (glioblastome multiforme)	454	-	-	522	-	
	Récepteur de l'urokinase uPAR (cancer du sein)	517	-	-	522	-	
	EGFRvIII (gliome)	517	-	-	-	-	
	EGFR (multiples malignités)	381	519	520	-	524	
	HER2/neu (cancer de l'ovaire, du sein)	518	-	521	523	-	
	protéoglycane d'héparane sulfate (cancer du sein)	-	-	-	-	527	
	Intégrine α v β 3, RGD cyclique et l'échistatine (cellules endothéliales des néo-vaisseaux)	525	-	526	-	-	
	EpCAM (multiples malignités)	-	-	-	524	-	
	Utilisation des DARPIn (ciblage bispécifique pour les marqueurs tumoraux EGFR, HER2/neu ou EpCAM)	528	-	-	-	-	
	microRNA-7 (glioblastome multiforme)	453	-	-	-	-	
	miR-122, miR-7 et miR-148a (cancer du pancréas)	529	-	-	-	-	
	miR-143 ou miR-145 (cancer de la prostate)	-	-	-	532	-	
	miR-143 ou miR-124 (cancer de la vessie)	-	-	-	533	-	
	miR Let-7 (Cancer du sein)	-	530	531	-	-	
	Ligands de liaison spécifique de la tumeur par la technique « ligand display » (multiples malignités)	534	-	526	-	-	
	Antigène PSMA (cancer de la prostate)	348	-	519	-	535	
	Métalloprotéase MMP-2 (cancer du foie)	404	-	-	-	-	
	creatine phosphokinase (polypeptides avec une forte affinité pour leur cible ; glioblastome)	529	-	-	-	-	
	<i>Gène viral sous le contrôle du promoteur du/de :</i>						
	B-myc, nestine, Musashi1 (gliome)				536 332 537	543 416	
	Mucin-1, α -foetoprotéine, β -caténine (cancer du foie)				538 539 540	544 545	
	Midkine ou cyclooxygénase-2 (cancer gastrique)				-	546	
	Papillomavirus HPV-16	-	-	-	-	547	
	Squamous Cell Carcinoma Antigen 2 (cancer du col utérin)				-	548	
Mésothéline (cancer de l'ovaire)				-	549		
Téломérase hTERT				541	-		
HIF (voie hypoxique, multiples malignités)				542	-		

	gp160 du VIH (spécifique des LT CD4+ transformées, leucémie / lymphome)	-	-	550	-	-
Améliorer la traçabilité	Fluorochrome GFP	551	552	554	555	559
	RFP	-	553	-	556	560
	mCherry	-	-	-	557	561
	tdTomato	-	363	-	558	-
	Antigènes solubles carcino-embryonnaires (CEA) ou gonadotrophine chorionique humaine (hCG)	562	563	-	-	565
	Gène rapporteur pour la formation d'une immunoglobuline chimérique (myélome)	562	564	-	-	566
	Suivi de la luciférase sous le contrôle de promoteurs viraux	567	-	-	-	-
	Mesure de l'iode 123 ou 131 par PET ou SPECT/CT après absorption via le symporteur d'iode et de sodium thyroïdien humain (NIS) codé par le virus	-	-	-	568	-
	Mesure de l'iode 123 ou 131 par PET ou SPECT/CT après absorption (substrat sélectif pour thymidine kinase virale)	496	570	571	-	573
	Mesure de l'iode 124 ou 131 par PET après absorption (substrat sélectif pour thymidine kinase virale)	569	489	572	-	-
Mesure de l'indium-111 par PET après absorption via le récepteur de la somatostatine (SSTR2) codé par le virus	-	-	-	574	-	
Mesure de l'indium-111 par PET après absorption via le Récepteur de la norépinéphrine (hNET) codé par le virus	-	575	-	-	576	
Mesure de MIBG par PET ou SPECT/CT après absorption via le Récepteur de la norépinéphrine (hNET) codé par le virus	-	577	-	-	-	
Armer les virus oncolytiques	<i>Gène suicide codé par le virus :</i>	<i>Prodrogue convertie en composé cytotoxique :</i>				
	Purine Nucléoside	393	579	-	-	-
	Phosphorylase (PNP)	578	-	-	-	-
	Cytosine désaminase (CD)	-	530	580	582	584
	Fusion de CD + uracile	381	396	581	583	-
	phosphoribosyltransférase	-	-	-	-	585
	MnSOD ou FCU1	-	-	-	-	586
	LacZ + β -gal cellulaire	-	423	-	-	-
	Transgène CYP2B1	-	-	-	587	-
	Enzyme nitroreductase	-	-	-	588	589
	Carboxylesterase de lapin	-	-	-	591	-
	Carboxypeptidase G2	-	-	-	-	592
	Linamarase	-	-	-	-	593
Virus portant la thymidine kinase d'un HSV	-	-	-	594	595	
	Gancyclovir ou carboxylesterase	-	-	-	-	596
Optimiser l'immunogénéicité	IFN- β	488	597	312	-	599
	IFN- α	-	-	-	-	600
	IFN- γ	-	-	598	-	-
	IL-4	-	-	554	604	-
	IL-4 +/- IL-10	-	-	-	-	608
	IL-12	601	-	601	605	609
	IL-15	-	-	602	606	-
	IL-18	-	-	-	607	607
	IL-23	-	-	603	-	-
	IL-24	-	-	-	-	603
	shRNA-IL-8	-	-	-	-	610
	CCL-5	-	611	-	-	-
	CCL-19	-	612	-	-	-
	CCL-7	-	-	-	-	613
	GM-CSF	466	288	614	615	616
	Cytokine-induced killer (CIK)	617	-	-	-	-
protéine activatrice des neutrophiles Helicobacter pylori	418	-	-	-	-	
Antigène de tumeur spécifique (OVA, gp100)	-	618	619	-	-	

	Trimère monocaténaire d'un CMH-I avec un épitope Tax (protéine virale de l'HTLV-I immuno-stimulatrice)	-	620	-	-	-
	aCTLA-4 et aPD-L1	481			-	-
	Immunoglobuline B7-1 soluble	-	-	-	607	621
	4-1BB (CD137)	-			-	622
	TNF- α	-	-	-	623	613
	15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase (HPGD-15)	-	-	-	624	-
	Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3)	-	-	-	-	625
	Heat shock proteins 70 (HSP70)	-	-	-	-	626
FMS-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt3L)	-	-	-	627	-	
Anti-angiogénèse	inhibiteurs de l'endostatine et angiostatine	478	382	628	629	630
	Inhibition De la voie du VEGF	-	631	-	-	632
	Platelet factor 4 (PF4)	-	-	-	633	-
	sTGF β RII (antagoniste soluble de TGF- β)	-	-	-	-	634
Cellules Carrier	Lymphocytes T	635		-	-	-
	Tumor-associated macrophages (TAM)	636		-	-	-
	Cellules tumorales	-		639	641	644
	Cellules endothéliales du sang humain (BOEC)	637	-	-	-	-
	Cellules suppressives dérivées des myéloïdes (MDSC)	-		640	-	-
	Cellules souches mésenchymateuses	638		-	642	645
Cellules mésothéliales	-		-	643	-	
Autres	Métalloprotéase -2		-		-	648
	MMP-3	-	-	-	647	649
	MMP-9		646		-	-
	TRAIL +/- TNFSF10		650	-	-	653
	CD40L	-	363	651	-	654
	FasL		-	-	652	-
	RNAi Bcl-2 et Survivin				655	-
	ShRNA XIAP				-	656
	Smac	-	-	-	-	657
	BAX				-	658
l'érythropoïétine	-	659	-	-	-	

Tableau 2. Modifications apportées aux virus oncolytiques de la rougeole (MV), de la vaccine (VV), de la stomatite vésiculaire (VSV), de l'herpès (HSV) et de l'adénovirus (AdV).

Les numéros inscrits dans le tableau sont des références bibliographiques.

Remarque : Pour une question de clarté, une seule référence bibliographique a été sélectionnée par modification et par virus. J'ai choisi de présenter, dans la mesure du possible, la première publication faisant états de ces différentes modifications. Par ailleurs, les cancers cités entre parenthèse dans ce tableau ne se rapportent qu'aux références données, d'autres cancers ont donc pu être étudiés dans les mêmes conditions.

A. Optimiser la spécificité

Le MV a été décrit précédemment comme ayant un tropisme naturel pour les cellules cancéreuses. De nombreuses stratégies ont cependant été mises en place pour améliorer sa spécificité tumorale et assurer une meilleure sécurité du traitement. La fixation du MV à la cellule tumorale nécessite l'interaction de la protéine virale H (hémagglutinine) avec le CD46²⁴⁷. L'identification précise des acides aminés nécessaires pour cette fixation a permis une

insertion de ligands spécifiques des tumeurs dans la région C-terminale de cette protéine. Ainsi, des fragments d'anticorps à chaîne unique (scFv : single-chain Fragment variable) dirigés contre les antigènes de tumeurs PSMA (Prostate-Specific Membrane Antigen)³⁴⁸, le récepteur des folates alpha (FR- α : folate receptor)⁴³³, CD38⁴⁹⁷ et CD20⁴⁶⁹ ont été générés pour faciliter l'entrée du MV dans les cellules cancéreuses de prostate, de l'ovaire, de myélome, et de lymphome non hodgkinien, respectivement. La protéine d'entrée du MV est remarquablement flexible et adaptable et les modifications apportées sont stables dans le temps. Cependant, la variabilité de l'affinité et la spécificité pour les cibles tumorales peuvent engendrer des différences d'efficacité d'entrée ou de fusion virale⁶⁶⁰. Récemment, l'insertion des DARPIn (Designed Ankyrin Repeat Proteins) à l'extrémité de la protéine H a été évaluée comme domaine de ciblage alternatif au scFv. Les DARPIn sont composées de protéines ankyrines répétées dans lesquelles des résidus randomisés ou créés par consensus permettent une interaction avec des cibles avec une forte affinité et spécificité. Ainsi, le Dr. Friedrich et ses collègues ont créé plusieurs MV recombinants bispécifiques pour les marqueurs tumoraux EGFR, HER2/neu (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2) et/ou EpCAM⁵²⁸.

Une approche alternative pour rediriger l'entrée virale consiste à modifier les propriétés de fusion des OV. Pour cela, l'activation par clivage de la protéine F du MV initialement réalisée par la furine au niveau du site (Arg-Arg-His-Lys-Arg) peut être redirigée vers d'autres enzymes spécifiques des tumeurs telles que les métalloprotéinases matricielles (MMP). Les MMP sont des endopeptidases nécessaires à l'invasion et la progression métastatiques des cancers. La substitution du site de clivage permet de restreindre l'activité virale aux cellules tumorales^{207,404,661}.

Après l'entrée du virus, il est possible de restreindre la spécificité des OV en contraignant leur réplication dans les cellules tumorales. Concernant le MV, cette technique est basée sur l'expression tissu-spécifique des microARN (miR). Les miR sont des régulateurs traductionnels de nombreuses fonctions cellulaires essentielles qui s'apparient de manière complémentaire à un ARNm messenger afin de réprimer sa traduction et de provoquer sa dégradation⁶⁶². En plus d'une expression différentielle en fonction des tissus, certains miR présentent un profil d'expression perturbé dans les cellules cancéreuses pouvant les distinguer des tissus sains⁶⁶³. Le miR-7 est exprimé par exemple dans les cellules neuronales saines et est absent dans les cellules de glioblastome multiforme puisqu'il réprime l'expression de l'EGFR⁶⁶⁴. Le Dr. Leber et ses collègues se sont basés sur cette différence et

ont inséré une séquence sensible au miR-7 dans le génome du MV. Ainsi, la réplication virale a été maintenue dans les xénogreffes murins de glioblastome multiforme et réprimée dans le tissu neuronal sain ⁴⁵³.

Tel que décrit précédemment, le virus de la vaccine n'était pas initialement spécifique des cellules tumorales et a dû subir des modifications de son génome dont des délétions ou mutations de la thymidine kinase, de la ribonucléotide réductase ^{136 137}, du facteur de croissance viral VGF ²⁹⁰ et de la protéine EL3 ²⁹³. L'équipe du Dr. Song a cependant cherché à améliorer la spécificité du mutant du VV à double délétion (vvDD) codant pour un activateur des cellules T bispécifiques (ou BiTE : bispecific T-cell Engager). Le BiTE se lie à la fois à l'antigène de tumeur EphA2 (EphA2-scFv-CD3-scFv), puis à la molécule CD3 présente en surface des lymphocytes T à proximité permettant ainsi leur activation. L'infection des cellules tumorales EphA2-positives par le VV mutant a pour conséquence une forte activation des lymphocytes T *in vitro* et *in vivo* ⁵¹³.

B. Améliorer la traçabilité

La surveillance et le suivi pharmacocinétique du virus sont essentiels lors d'un traitement par virothérapie. En effet, une traçabilité *in vivo* des OV peut apporter des éléments d'explication en cas de succès, comme en cas d'échec du traitement tels que l'excès ou le manque d'infection ou d'effet cytopathique, une élimination rapide du virus ou encore d'une propagation virale anormale dans les tissus sains. Diverses méthodes *in vivo* non invasives ont été mises en œuvre.

Une des premières méthodes a été d'insérer les séquences codant pour des peptides solubles tels que l'antigène carcino-embryonnaire (CEA : Carcinoembryonic Antigen) ou la gonadotrophine chorionique humaine (hCG : human Chorionic Gonadotropin) dans le génome des OV ⁵⁶²⁻⁵⁶⁴. L'antigène CEA est une glycoprotéine qui possède une demi-vie circulante de 36 heures. Il est caractérisé comme un marqueur sérique de la malignité tumorale. La hCG est une hormone placentaire humaine avec une demi-vie de 30 heures dans le sang et les urines. Outre son rôle dans le diagnostic de grossesse, sa quantification peut permettre un suivi d'une régression tumorale trophoblastique ⁵¹³. L'ajout des gènes codant pour CEA et hCG au VV a été réalisé très tôt dans les années 90 et avait pour but de stimuler une réponse immunitaire humorale tout en suivant la progression virale ^{563,564}. Chez le MV, la transcription

en gradient de 3' vers 5' permet une forte production de CEA ou de hCG qui sont sécrétées et détectables en temps réel comme marqueurs de la réplication virale dans le sang et l'urine ⁵¹³.

Le symporteur d'iode et de sodium thyroïdien humain (NIS) est un marqueur performant pour le suivi viral qui a été beaucoup étudié et utilisé. Le NIS est un canal ionique membranaire qui permet l'absorption d'iode dans la glande thyroïdienne. L'ajout du NIS dans le génome des OV va permettre son expression en surface des cellules infectées. Une administration d'un traceur (dont l'iode I123 ^{496,570} et I131 ⁴⁸⁹), isotopes radioactifs émettant des rayonnements γ , permet une détection des cellules infectées par imagerie PET ou SPECT/CT. Cette technique donne des indications sur la localisation de la réplication virale. Des modèles de xénogreffes de myélome multiple ⁴⁹⁶, de cancer de la prostate ³⁵⁰, de glioblastome ⁴⁵⁷, de la tête et du cou ³⁸⁰, de la thyroïde ^{356,359} du pancréas ⁵⁷⁰, gastrique ³⁷⁶ et du mésothéliome pleural malin ⁴⁸⁹ ont démontré qu'un suivi viral efficace peut-être obtenu par cette technique après traitement par le MV ou le VV codant le NIS. D'autre part, un effet cytotoxique sur les cellules tumorales synergique des OV associés au NIS doit être souligné dû aux dégâts cellulaires provoqués par les radiations du traceur radioactif ⁴⁹⁶.

De manière similaire au NIS, les gènes du récepteur humain de la somatostatine 2 (SSTR2 : Somatostatin Receptor Type 2) ⁵⁷⁵ et du récepteur norépinéphrine ⁵⁷⁷ ont été insérés dans le génome du VV. Ces récepteurs lient sélectivement les radio-traceurs indium-111 et méta-iodobenzylguanidine (MIBG), respectivement, et permettent ainsi le suivi du virus par imagerie dans les tissus profonds.

Le MV-IgG- λ a été généré par insertion d'une chaîne d'immunoglobuline légère lambda en amont de la protéine N pour le traitement du myélome multiple. L'infection entraîne l'expression et la sécrétion d'une immunoglobuline chimérique (une chaîne λ et une chaîne κ surproduite dans le myélome) quantifiable dans le sang par dosage immunologique ⁵⁶⁷.

C. Armer les virus oncolytiques

Les « gènes suicides » sont des gènes insérés dans le génome des OV qui catalysent la conversion d'une molécule chimiothérapeutique en composé hautement toxique. L'agent cytotoxique est transformé spécifiquement dans la tumeur. Un grand nombre de gènes suicides sont utilisés pour armer les OV. La PNP d'*Escherichia coli* (Purine Nucléoside Phosphorylase) est une convertase qui transforme les promédicaments phosphate de

fludarabine (F-araAMP) et 6-méthylpurine-2'-deoxyriboside (MeP-dR) en composés cytotoxiques 2-fluoroadénine et 6-méthylpurine (MeP), respectivement ⁶⁶⁵. Une injection du VV exprimant la PNP et de MeP-dR par voie intrapéritonéale à des souris athymiques avec des métastases hépatiques a montré une prolongation significative de la survie et un taux de guérison de 30% ⁵⁷⁹. Plus tard, un modèle de xéno greffe de lymphome de Burkitt a montré un effet synergique après administration par voie systémique du MV ciblant le CD20 et portant le PNP (MV-CD20-PNP) suivie d'injection de F-araAMP ⁵⁷⁸. D'autre part, une étude similaire utilisant le MV-CEA-PNP a montré une rémission complète pour 9 souris C57BL/6 sur 10 d'une xéno greffe d'adénocarcinome du colon syngénique ³⁹³.

Une autre enzyme convertase appelé Super-Cytosine Deaminase (SCD) a été insérée dans le génome des OV. Cette molécule est issue d'une fusion de deux enzymes, la Cytosine Deaminase (CD) et l'Uracil phosphoribosyltransferase (URPT), isolées de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. La SCD convertit le promédicament 5-fluorocytosine (5-FC) en 5-fluorouracile (5-FU) puis en 5-fluorouridine-monophosphate. De par sa capacité à interférer dans les processus biologiques cellulaires essentiels tels que la réparation et la synthèse d'ADN, le métabolite généré provoque une toxicité des cellules infectées ⁶⁶⁶. La SCD est l'enzyme la plus fréquemment associée au VV et présente de meilleurs effets thérapeutiques en comparaison du virus seul dans plusieurs cancers ⁶⁶⁶ (cancer de l'ovaire ⁴⁴⁰, colorectal ^{396,667}). Concernant le MV, l'injection du MV-SCD suivie de l'administration de 5-FU chez les souris xéno greffées provoque une régression tumorale importante dans le cancer du foie ⁴⁰⁶, de la tête et du cou ³⁸¹ et du mélanome ⁴⁸⁰.

Enfin, la souche GLV-1h68 du VV portant le gène *lacZ* a été utilisée en combinaison avec un promédicament, un dérivé du duocarmycine SA, activable par la β -galactosidase et a des effets bénéfiques sur la régression tumorale dans un modèle de souris xéno greffées de cancer du sein ⁴²³.

D. Bloquer l'angiogénèse

Afin d'inhiber le système vasculaire tumoral, des OV ont été créés pour libérer des agents anti-angiogéniques dans la tumeur. Plusieurs constructions permettant d'inhiber le VEGF ont été insérées dans le VV. On retrouve par exemple la fusion des gènes codant un anti-VEGF endostatine/angiostatine ⁶⁶⁸, la fusion du récepteur du VEGF1 avec la queue Fc de

l'anticorps IgG humain (VEGFR-1-Ig) ⁴⁴⁹ et les anticorps monocaténaires anti-VEGF (GLAF-1) ⁶³¹. De la même manière, le MV a lui aussi été modifié pour exprimer les inhibiteurs de l'angiogenèse endostatine et angiostatine pour le traitement du médulloblastome ⁴⁷⁸. Dans tous les cas, la réduction de la vascularisation tumorale s'accompagnait d'une régression de la tumeur.

E. Optimiser l'immunogénicité des virus oncolytiques

Les efforts pour améliorer les propriétés lytiques des OV se sont multipliés ces dernières années. La capacité des OV à activer le système immunitaire et à induire une réponse dirigée contre la tumeur a maintenant été largement démontrée. C'est pourquoi, des modifications visant à optimiser l'immunogénicité des OV a été la source d'un grand nombre d'études.

Afin de contribuer à la réponse immunitaire, un des premiers exemples a consisté à insérer dans le génome des OV le gène codant pour le GM-CSF humain. Le GM-CSF est un immuno-modulateur paracrine impliqué dans le recrutement des cellules immunitaires. Dans les modèles murins de lymphome de Burkitt et d'adénocarcinome du colon traités par le MV-GM-CSF, l'infiltration neutrophile est augmentée due aux propriétés chimiotactiques du GM-CSF et les fonctions des NK et des macrophages sont améliorées ⁴⁶⁶. Les souches du VV JX-963 ²⁹¹ et JX-594 ²⁸⁸ codant pour le GM-CSF permettent de réduire la charge tumorale et d'induire une augmentation significative des lymphocytes T cytotoxiques infiltrant des tumeurs hépatiques dans un modèle chez le lapin. Pour le traitement du mésothéliome humain, une étude a montré que l'association du MV au gène codant l'IFN- β murin (MV-IFN- β) favorisait là encore l'infiltration des cellules de l'immunité innée provoquant un ralentissement de la croissance tumorale et exerçait un effet anti-angiogénique ⁴⁸⁸. La souche du VV JX-795 (IFN- β^+) présentait aussi une sélectivité tumorale et une efficacité systémique améliorée ⁵⁹⁷. D'autres protéines possèdent des propriétés immunostimulantes en association avec le MV telle que la protéine activant les neutrophiles (NAP : Neutrophil Alkaline Phosphatase) dérivée d'*Helicobacter pylori* (MV-NAP) ⁴¹⁸.

Plus récemment, un grand intérêt s'est porté sur les inhibiteurs des points de contrôle immunitaire (CPI) tels que les anti-CTLA-4 et anti-PD-1/PD-L1. Comme décrit précédemment, ces molécules limitent la prolifération non contrôlée des lymphocytes T et participent au

contrôle des réactions auto-immunitaires. Suite à l'approbation de la FDA pour leur utilisation en clinique, plusieurs OV ont été générés qui codent les CPI pour cibler un large spectre de tumeurs. Ainsi, les combinaisons du MV avec les molécules CTLA-4 (MV- α CTLA-4) et PD-L1 (MV- α PD-L1) ont fait leur apparition. La survie de modèles de mélanome chez la souris est prolongée et associée à une infiltration des LT cytotoxiques et une diminution des LT régulateurs ⁴⁸¹.

V. Etudes précliniques

A. Modèles immunocompétents

La souche atténuée du virus de la rougeole n'infecte pas les cellules murines qui n'expriment pas de récepteurs d'entrée de ce virus. Il est par conséquent difficile de l'étudier dans des modèles immunocompétents. C'est pourquoi, la majorité des études in vivo rapporte son efficacité dans un large panel de cancers dans des modèles de xénogreffes de cellules cancéreuses humaines implantées chez des souris immunodéficientes. Cependant, cette approche ne permet pas d'analyser les effets du traitement sur le système immunitaire. Quelques équipes ont néanmoins développé des modèles murins immunocompétents afin de contourner ce problème.

La première technique mise en place fut de réorienter le virus vers un autre récepteur désigné en conjuguant des ligands de ces récepteurs à la protéine de fixation virale, l'hémagglutinine (H). Ainsi, l'équipe du Dr. S Cattaneo a re-ciblé le MV vers l'antigène carcinoembryonnaire humain (CEA) exprimé par une lignée murine cellulaire d'adénocarcinome du colon modifiée pour exprimer cet antigène, la lignée MC38cea ³⁹³. Cette lignée est tumorigène chez des souris syngéniques C57BL/6. La réplication dans les cellules murines étant sous optimale, le virus MV-CEA fut armé avec la purine nucléoside phosphorylase (PNP) d'*Escherichia coli* capable de transformer la prodrogue MeP-dR et drogue toxique MeP. Cette modification a amplifié l'effet oncolytique du virus en retardant significativement la croissance tumorale et en prolongeant la survie de la souris. Ce modèle a aussi permis aussi de montrer un retard significatif de la croissance tumorale et une rémission complète de 3 souris sur 8 jusqu'à 6 mois suite à un traitement par le MV-CEA couplé au GM-CSF ⁶⁶⁹.

De manière similaire, le MV a été modifié pour cibler les lignées murines du colon CT26 et mammaire 4T1 surexprimant le récepteur de l'urokinase (pPAR) à leur surface (MV-m-uPA) et démontre des effets antitumoraux significatifs et une survie prolongée ⁶⁷⁰. Le MV a aussi été modifiée pour cibler le récepteur CD20 exprimé sur la lignée murine de mélanome malin B16-CD20 et pour exprimer les Ac de point de contrôle anti-CTLA-4 et anti-PD-L1 (MV-aCTLA-4 et MV-aPD-L1) ⁴⁸¹. Dans le cas de souris traitées avec MV-aPD-L1, un sous-groupe de souris a présenté une rémission partielle de la tumeur avec une implication des lymphocytes T CD8+. Le MV-aCTLA4 était moins efficace avec une absence d'amélioration de la survie globale chez les souris traitées.

En 2016, l'équipe du Dr. E Galanis a montré une infection limitée (15%) avec un MV modifié, le MV-GFP-EGFR, redirigé vers le récepteur EGFR surexprimé sur les cellules de gliome GL261 ⁴⁵⁸. Le MV-GFP-EGFR a été injecté *in vivo* avec un l'inhibiteur de point de contrôle anti-PD1 chez des souris syngéniques C57BL/6 et a montré une survie à long terme (>120 jours) chez 60% des souris. Cette survie était accompagnée d'une augmentation des lymphocytes T CD8+ produisant la protéase granzyme.

Très récemment, l'équipe du Dr. Ungerechts a réalisé une transduction stable du récepteur CD46 aux lignées B16-CD20 et MC38-CEA ⁶⁷¹. Dans cette étude le traitement par le virus MV-BiTE (bispecific T-cell Engager) décrit précédemment (Parte II – chapitre VI – A. Optimiser la spécificité) a été évalué. En accord avec la sensibilité limitée des cellules murines à l'oncolyse MV, l'infection de cellules MC38-CEA et B16-CD20-CD46 *in vitro* a réduit la viabilité cellulaire de seulement 40% à 60%. Dans leur étude *in vivo*, seule la lignée B16-CD20-CD46 a pu être greffée dans le modèle de souris syngéniques C57BL/6. Dans le modèle B16-CD20-CD46, le MV codant pour le BiTE correspondant (mCD3xCD20) a significativement prolongé la survie par rapport au MV codant un BiTE irrelevant (mCD3xCEA) ou au MV non modifié. Etonnamment, il n'y avait pas de différence significative entre MV-BiTE irradié par UV et non irradié. Une augmentation des lymphocytes T activés infiltrant la tumeur et de polarisation TH1 a aussi été observée. Dans ce modèle, la réplication virale et l'expression de BiTE a montré une progression limitée du virus ce qui nécessite donc d'établir une tumeur murine avec une meilleure permissivité au MV.

Contrairement au MV, le virus de la vaccine est capable d'infecter les cellules issues de rongeurs ce qui a permis l'étude de son activité oncolytique contre un large éventail de

cancers in vitro et in vivo dans des modèles immunodéficients et immunocompétents. De nombreuses études ont ainsi évalué et rapporté une certaine efficacité des souches JX-594^{288,461}, JX-963, VVDD seul^{490,672} ou codant l'EGFP⁴⁶⁰, le tdtomato⁶⁷³, le VEGFR⁴⁴⁹ ou la cytosine désaminase⁶⁷⁴, chez des modèles immunocompétents murins (Lignée MOSEC : carcinome ovarien⁶⁷⁴ ; lignées RENCA⁴⁴⁹ et M38 : adénocarcinome de rein⁶⁷⁵; lignée GL261 : gliome⁴⁶¹ ; lignée 4T1 : cancer mammaire⁶⁷² ; lignées AC29 et AB12 : mésothéliome⁴⁹⁰), de rat (Lignée RG2⁴⁶¹ et F98 : gliome⁴⁶⁰), de hamster syrien (Lignée HapT1 : carcinome pancréatique⁶⁷³) et de lapin (Lignée VX2 : cancer hépatique^{288,291}).

Récemment, l'équipe du Dr. Zitvogel en collaboration avec l'entreprise Française Transgene a évalué in vivo la souche Western Reserve VV/TK-RR-/FCU1 dont les gènes de la thymidine kinase et la ribonucléotide réductase ont été délétés et qui code pour une enzyme chimérique, le 5FCU1, qui convertit la prodrogue 5-FC en drogue toxique 5-FU⁶⁷⁶. L'utilisation de ce virus a permis un retardement de la croissance tumorale significatif et une survie accrue dans deux modèles murins immunocompétents avec la lignée de sarcome MCA205 établie chez la souris C57BL/6 et la lignée de carcinome du colon CT26 établie chez la souris BALB/c. Les auteurs ont mis en évidence chez les souris traitées une réponse immunitaire antitumorale avec une augmentation du nombre des lymphocytes T CD8+ et une réduction des cellules régulatrices ce qui permet un contrôle des tumeurs à distance du site d'injection. Ils ont aussi montré que l'efficacité du virus dépend de l'induction d'une mort immunogène impliquant HMGB1 et son récepteur apparenté TLR4, ainsi que l'ATP et la chimiokine CXCL10. D'autre part, lorsque les cellules tumorales sont rendus déficientes pour la signalisation IFNAR, le traitement est plus efficace avec une régression complète dans la majorité des cas. Ce résultat indique que les tumeurs déficientes en IFNAR sont beaucoup plus sensibles au WR. Enfin, l'association du virus avec l'oxaliplatine, un agent qui induit une forte mort immunogène, ou avec des inhibiteurs de points de contrôle anti-CTLA-4 et anti-PD-1 entraînait une amélioration synergique du contrôle tumorale locale et à distance, ainsi que de la survie.

B. Modèles murins humanisés

L'équipe du Dr Ungerechts a récemment évalué l'efficacité du MV-BiTE (MV-hCD3xCEA) dans un modèle de sphéroïdes de cancer du côlon dérivés d'un patient xénotransplanté chez des souris NGS⁶⁷¹. Ces souris extrêmement immunodéficientes permettent la greffe d'une

large gamme de cellules humaines primaires et permettent notamment l'établissement d'un système immunitaire fonctionnel et humanisé à partir de cellules souches hématopoïétiques humaines greffées et progénitrices. Ici, les auteurs ont réalisé les xénogreffes suivie d'injection du MV-BiTE combinée avec de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC : peripheral blood mononuclear cell) humaines autologues et non stimulées. Cette combinaison a montré des effets synergiques et une survie significativement prolongée par rapport au traitement par PBMC ou MV-BiTE seuls.

Le virus de la Vaccine a aussi été évalué avec un modèle de souris tumorale humanisé. Dans cette étude, les souris NGS sont irradiées puis transplantées par voie intrahépatique avec des cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ dérivées du sang de cordon humain⁶⁷⁷. Cela permet une reconstitution stable et fonctionnelle de plusieurs lignées du système immunitaire humain, tout en développant des tumeurs solides et des métastases tumorales sans signe de rejet. Ensuite, la lignée cancéreuse pulmonaire humaine A549 a été implantée en sous cutanée 9 à 13 semaines après l'humanisation. La souche du virus de la vaccine GLV-1h376 codant pour un anticorps bloquant le CTLA-4 humain a été administrée par voie systémique lorsque les tumeurs atteignaient une taille moyenne (250–350 mm³). Ce virus n'a pas été en mesure d'augmenter les taux de cellules T cytotoxiques ou globales NK dans l'environnement tumoral et aucune augmentation des marqueurs d'activation n'a été détectée. L'hypothèse plausible posée par les auteurs était une absence d'exposition des lymphocytes aux antigènes associés à la tumeur en raison de la présence de cellules présentatrices d'antigène dysfonctionnelles voire absentes dans le modèle de souris humanisé. Néanmoins, la mesure du titre viral et du l'anti-CTLA-4 a permis de démontrer leur présence sur le site de la tumeur.

VI. Essais cliniques

En 2004, l'échovirus Rigvir a été le premier virus oncolytique approuvé en Lettonie pour le traitement du mélanome après une exérèse chirurgicale. Un an plus tard, l'adénovirus H101 en combinaison avec le cisplatine a été approuvé en Chine pour le traitement du carcinome nasopharyngé^{115,116}. A l'heure actuelle, ClinicalTrials.gov répertorie environ 1800 essais cliniques en immunothérapie oncolytique dont certains ont démontré le potentiel thérapeutique des virus oncolytiques contre une grande variété de cancers²⁰⁵.

A. Virus de la rougeole en clinique

Le premier essai clinique de phase I avec la souche Edmonston-Zagreb du MV était une étude de la relation dose/effet chez 5 patients atteints d'un lymphome cutané à cellules T de stade IIb ou plus ⁴⁶⁸. Le traitement consistait à administrer de l'IFN- α en sous-cutané 72h et 24h avant deux injections intra-tumorales consécutives du MV en concentrations croissantes (de 100 à 1000 TCID50). Une régression de 5 lésions sur 6 injectées (2 lésions injectées pour un des patients) était visible et des lésions à distance avaient régressé pour 2 patients. L'évaluation des biopsies avant et après traitement a montré la présence du MV ainsi qu'une augmentation de l'IFN- γ et des lymphocytes T CD8 + sur le site de la tumeur.

En 2010, l'Equipe du Dr. Galanis a réalisé un essai de phase I d'administration en intrapéritonéal de la souche Edmonston du MV conçue pour exprimer l'antigène carcino-embryonnaire (MV-CEA) ⁴³⁷. Cet essai incluait 21 patientes atteintes d'un cancer ovarien récurrent et réfractaire aux traitements chimiothérapeutiques existant avec une sérologie positive contre le MV (IgG anti-MV > 20 Unités ELISA/mL). Le MV-CEA a été administré à des doses croissantes comprises entre 10^3 et 10^9 TCID50 jusqu'à 6 cycles toutes les 4 semaines. La maladie s'est stabilisée chez 14 des 21 patientes avec une survie globale médiane de 15 mois en lien direct avec la dose injectée, soit le double de la survie normalement attendue. Aucune toxicité n'a été déplorée même aux plus fortes doses. De plus, grâce à un immunodosage, le CEA a été retrouvé dans le liquide péritonéal et le sérum de manière dose-dépendante permettant ainsi le suivi de la réplication virale en temps réel surtout après chaque injection.

De manière très similaire, une deuxième évaluation clinique de phase I sur le cancer de l'ovaire a été élaborée avec le MV codant le symporteur d'iode sodique (MV-NIS) ²⁰². Le NIS assure un suivi des tissus infectés par imagerie SPECT/CT. Dans cet essai clinique, 16 patientes ont subi des injections des deux doses les plus élevées précédemment utilisées, soit 10^8 et 10^9 TCID50. Leur survie globale médiane était de 26,5 mois avec une expression du NIS associée à une longue survie sans progression et une augmentation des lymphocytes T effecteurs.

En 2014, l'équipe du Dr. Russell a publié des résultats préliminaires remarquables d'une rémission de myélome multiple disséminé réfractaire aux traitements standard chez deux patientes ²⁵². Ces patientes, séronégatives pour la rougeole, ont été perfusées en intraveineux avec 10^{11} TCID50 de MV-NIS. Six semaines après injection, le plasmacytome de la patiente 1 n'était plus palpable contrairement à la patiente n°2 pour laquelle aucun signe

de rétrécissement des plasmacytomes n'était visible. En avril dernier, la patiente n°1 Stacy Erholtz a été invitée au 11ème congrès international annuel sur les virus oncolytiques qui s'est tenu à Oxford (International Oncolytic Virus Conference 2018) pour parler de son parcours et de la rémission stable et durable de sa maladie 5 ans après traitement.

Les résultats complets de cet essai de phase I ont été publiés en décembre 2017. Trente-deux patients ont été traités soit par le MV-NIS seul ou soit précédé par une chimiothérapie à base de cyclophosphamide ⁶⁷⁸. Initialement, 4 doses de virus comprises entre 10^6 et 10^9 TCID50 ont été administrées puis ont été réévaluées à 10^{10} et 10^{11} TCID50. Même aux doses les plus élevées, le MV-NIS était bien toléré avec des événements indésirables qui ne dépassaient pas le grade 3-4. Le virus a été retrouvé dans les sécrétions (urine et expectorations) seulement quelques jours après injection attestant de sa réplication et de son élimination par le système immunitaire. De façon intéressante, les expériences d'infectivité *ex vivo* et l'expression de CD46 sur les cellules plasmiques de la moelle osseuse n'ont pas pu prédire la réponse au traitement. Actuellement, un essai clinique de phase II est en cours selon les mêmes modalités : le traitement du myélome multiple réfractaire par le MV-NIS avec ou sans cyclophosphamide (NCT00450814).

Suite à ces résultats prometteurs, d'autres essais cliniques basés sur l'utilisation du MV ont vu le jour contre une grande diversité de malignité, notamment le glioblastome multiforme (NCT00390299), le mésothéliome (NCT01503177), le carcinome épidermoïde de la tête et du cou (NCT01846091), le myélome multiple (NCT02700230, NCT02192775), le cancer des ovaires, des trompes de Fallope et le cancer péritonéal (NCT02068794, NCT00408590, NCT02364713).

B. Virus de la vaccine, le JX-594

Le JX-594 aussi appelé pexastimogene devacirepvec (PexaVec) est un virus de la vaccine qui code pour le GM-CSF et la β -galactosidase (β -gal) et dont le gène de la thymidine kinase a été inactivé ²⁸⁸.

Les premiers essais cliniques de phase I avec le JX-594 ont donné des résultats prometteurs contre le mélanome ⁶⁷⁹ et le carcinome hépatocellulaire ⁶⁸⁰ seul ou en combinaison avec du sorafénib ⁴¹², un inhibiteur de B-raf et du VEGFR. En effet, le virus était bien toléré après injection en intratumoral. De plus, les injections ont été associées à une

infiltration lymphocytaire périvasculaire intense et ont induit des réponses cliniques tumorales objectives. Le JX-594 a également démontré un potentiel de livraison systémique dans les tumeurs solides métastatiques chez l'homme. Par ailleurs, l'étude TRAVERSE de phase II visant à comparer les injections intraveineuse et intratumorale du JX-594 est en cours.

Une étude effet/dose de phase II par injection en intratumoral de 30 patients atteints d'un carcinome hépatocellulaire avancé a démontré que la survie était significativement liée à la dose avec une survie médiane de 14,1 mois à la plus forte dose contre 6,7 mois à la plus faible ²⁸⁵. De plus, une forte infiltration lymphocytaire dans la tumeur et des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques des antigènes viraux et du transgène de la β -gal ont été mis en évidence. Ces différents travaux ont apporté des preuves de l'intérêt de poursuivre des essais cliniques de phase III avec le JX-594. C'est pourquoi, une étude randomisée de phase III avec le sorafénib seul ou en combinaison avec le JX-594 a été initiée (NCT02562755).

C. Virus de l'herpès simplex, le Talimogene Laherparepvec

L'HSV-1 Talimogene Laherparepvec ou T-Vec est le virus oncolytique le plus avancé en clinique dans les pays occidentaux. En effet, il a récemment été approuvé par la FDA des États-Unis, l'Agence européenne des médicaments et l'Australian Therapeutic Goods pour le traitement local des lésions cutanées, sous-cutanées et des nodules non résecables chez les patients atteints de mélanome métastatique ¹¹⁷. Ce virus présente des délétions des gènes *ICP34.5* et *ICP47* lui conférant une répllication sélective dans les tumeurs et exprime la cytokine GM-CSF afin de contribuer au recrutement des cellules immunitaires ³³⁰.

Un essai clinique de phase II multicentrique a évalué l'effet du T-Vec sur l'immunité antitumorale locale et distante par injection intra-lésionnelle directe chez 50 patients atteints de mélanome métastatique non opérable de stade IIIc et IV ⁶⁸¹. La dose initiale injectée était de 10^6 suivie de 10^8 pfu (plaque-forming unit) toutes les deux semaines en intratumoral. Treize patients (26%) ont eu des réponses cliniques objectives avec une régression locale et à distance des sites d'injection. Le taux de contrôle de la maladie était de 50% et la survie globale à un an de 58%. Le T-Vec a induit des réponses de cellules T effectrices CD8+ spécifiques de l'antigène de tumeur MART-1 (Melanoma-Associated Antigen Recognized by T cells) locale et systémique. Une diminution significative des lymphocytes T régulateurs et des cellules

suppressives dérivées des myéloïdes (macrophages et neutrophiles) a aussi été rapportée dans les lésions injectées.

Au vu de ces résultats remarquables, l'essai clinique randomisé OPTiM de phase III a été mis en place sur 436 patients atteints de mélanome de stade IIIB / IIIC / IV non résécable⁶⁸²⁻⁶⁸⁵. Cet essai clinique visait à comparer et évaluer le taux de réponse durable (DRR : durable rate response) entre des injections intra-tumorales de T-Vec ou l'injection de GM-CSF en sous-cutané (NCT00769704). La DDR, correspondant à une réponse objective supérieure à 6 mois, était de 16,3% pour le T-Vec et 2,1% pour le GM-CSF, avec une survie globale médiane de 23,3 mois contre 18,9 mois, respectivement. A 5 ans, le taux de survie chez les patients ayant été traités par le T-Vec était de 33,4%. De manière intéressante, les patients ayant reçu le T-Vec en première ligne répondaient mieux au traitement et leur sérologie contre le HSV n'a pas semblé affecter le taux de réponse. Des réponses immunitaires antitumorales systémiques, régionales et distantes ont été là encore mises en évidence. Enfin, presque aucun événement indésirable de grade supérieur à 3 n'a été déploré et les symptômes les plus fréquents étaient une fatigue, des frissons et une pyrexie.

L'inhibition des points de contrôle immunitaire par les CPI tels que les anti-PDL1, anti-PD1 et anti-CTLA-4 est en plein essor actuellement et donne des résultats très prometteurs. Etant donné la capacité du T-Vec à induire une réponse immunitaire antitumorale chez les patients, la combinaison avec les CPI a été évaluée. Une étude clinique de phase 1b/2 étudiant l'association de l'ipilimumab, un anti-CTLA-4, avec le T-Vec a été réalisée chez 19 patients atteints de mélanome de stade IIIB-IV²⁰⁴. Les résultats de la phase 1b révèlent une réponse durable supérieure à 6 mois chez 44% des patients et une survie globale à 18 mois de 67%, ce qui est meilleur que les résultats obtenus lors de l'évaluation de chacun des traitements seuls. Parallèlement, un autre essai multicentrique de phase 1b a vu le jour en 2014 pour comparer le pembrolizumab en monothérapie (anti-PD1) versus la combinaison du pembrolizumab et du T-Vec dans le traitement en première ligne du mélanome de stade IIIB-IV non résécable²⁰³. Les taux de réponses objective et complète étaient de 62% et 33%, respectivement. De plus, cette étude a montré que chez certains patients, l'injection intra-tumorale du T-Vec provoquait une infiltration lymphocytaire T CD8+ qui leur permettaient ensuite de répondre au pembrolizumab.

D'autres HSV-1 modifiés tel que le G207 (ICP34.5-et ribonucléotide réductase mutée) et le NV1020 (ICP34.5-) ont montré une absence de toxicité au cours de leur évaluation en

phase I pour le traitement du gliome malin et des métastases hépatiques du cancer colorectal, respectivement ⁶⁸⁶⁻⁶⁸⁹.

D. Adénovirus, les souches ONYX-015 et CG0070

Deux souches d'adénovirus oncolytiques sont actuellement en cours d'évaluation clinique, ONYX-015 et le CG0070.

La souche ONYX-015 est mutée dans le gène *E1B55* et lui confère une sélectivité pour les cellules tumorales avec une voie P53 inactivée. Un essai clinique de phase II sur le cancer de la tête et du cou (n=37) avec injection intra-tumorale de ONYX-015 en association avec le cisplatine et le 5-fluorouracile a été réalisé. Six mois après traitement, la progression tumorale au site d'injection était stoppée contrairement aux tumeurs non-injectées qui avaient continué leur progression ^{690,691}. ONYX-015 a été le premier OV approuvé en Chine en 2006 pour le traitement du carcinome nasopharyngé mais son manque d'efficacité a contraint l'Europe et les États-Unis à ne pas poursuivre son développement ¹¹⁶.

La souche CG0070, qui code pour GM-CSF et dont l'activité oncolytique est dirigée contre des cellules tumorales avec une voie E2F constitutivement activée a été testée en phase I pour le traitement du cancer de la vessie non invasif ⁶⁹². Les patients dans cette étude avaient tous continué de progresser après la thérapie par le Bacille Calmette et Guérin (BCG) qui est la thérapie de première ligne basée sur l'injection intra-vésicale du BCG et de chimiothérapie. Le CG0070 a alors été utilisé à la place du BCG. Le taux de réponse complète était de 48,6% avec une durée médiane de réponse complète de 12,4 mois. Ce virus est actuellement en essai multicentrique de phase III chez des patients atteints de carcinome vésical non invasif.

E. Autres virus en clinique

Un grand nombre d'autres virus sont également en cours d'évaluation clinique. Le REOLYSIN, une souche sauvage de réovirus, a largement été étudié seul ou en combinaison avec des chimiothérapies au cours de phases I, II et III dans le traitement d'un grand nombre de malignité ⁶⁹³ dont le cancer du sein métastatique ⁶⁹⁴, le cancer du poumon métastatique non à petites cellules ⁶⁹⁵, l'adénocarcinome pancréatique avancé (NCT02620423) ^{696,697}, le

mélanome malin ⁶⁹⁸ et le myélome multiple réfractaire (NCT02514382, NCT02101944) ⁶⁹⁹. Les résultats étaient dans l'ensemble positifs avec des survies globales améliorées et un bénéfice clinique, à l'exception de l'effet du virus sur l'adénocarcinome pancréatique qui n'était pas significativement différent du témoin.

Le parvovirus (ParvOryx01), le virus coxsackie (CATAVAK), le virus de la maladie de Newcastle (PV701 et MTH68/H) et le Virus de la vallée de Seneca (SVV-001) ont aussi été évalués dans des essais de phases I et II pour le gliome récidivant, le mélanome, des cancers solides et du cancer du poumon à petites cellules, respectivement.

Conclusion partie II

L'immunothérapie oncolytique est une approche thérapeutique anti-cancéreuse utilisant des virus sauvages, atténués ou modifiés qui se répliquent sélectivement dans les cellules tumorales. Les virus oncolytiques sont donc de puissants agents cytolytiques et activent une réponse immunitaire antitumorale robuste nécessaire pour éradiquer les tumeurs primaires et les métastases ce qui pourrait prévenir ensuite d'éventuelles récidives.

Le virus de la rougeole et de la vaccine, principalement étudiés au cours de ma thèse, ont des caractéristiques favorables à leur transfert en clinique. Ils sont d'ailleurs évalués dans plusieurs essais cliniques actuellement en cours chez des patients atteints de diverses malignités.

L'espoir de l'émergence de traitements contre le cancer de plus en plus performants est tangible compte tenu de la diversité croissante des modifications des OV et des combinaisons testées dans des études précliniques et cliniques. L'année 2015, marquée par l'autorisation de mise sur le marché d'un premier virus oncolytique, le T-Vec, aux États-Unis et en Europe sera sans aucun doute un tournant décisif pour le domaine ¹¹⁷. Cependant, un effort particulier devra être apporté aux traitements des cancers incurables tels que le mésothéliome pleural malin. Le choix de l'OV le plus efficace en fonction de la malignité nécessite une meilleure compréhension des activités oncolytiques des OV et de leurs effets favorables sur le système immunitaire antitumoral.

Partie III – Réponse antivirale cellulaire innée

La réponse immunitaire cellulaire est la première ligne de défense contre des agents infectieux tels que les virus. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans le contrôle de l'infection et l'élimination du pathogène. Au niveau de la cellule infectée, un processus appelé voie interféron de type I est la première barrière robuste pour lutter contre une infection virale. Je détaillerai dans cette partie la réponse interféron de type I ainsi que les mécanismes d'échappements élaborés par les virus. Ensuite, un parallèle sera fait entre cette voie de signalisation dans le cancer et son rôle majeur dans l'efficacité de l'immunothérapie oncolytique.

I. Voie interféron de type I, première ligne de défense cellulaire

La voie interféron de type I (IFN I) est l'une des premières réponses immunitaires de l'hôte présente chez la majorité des cellules. Cette réponse a trois objectifs principaux. Elle induit un état antiviral dans la cellule infectée mais aussi dans les cellules avoisinantes pour limiter la propagation de l'agent infectieux⁷⁰⁰. Elle régule l'action des cellules de l'immunité innée (CPA : Cell Presenting Antigen, NK : Natural Killer etc.) pour obtenir une réponse adaptée à la situation de danger en contrôlant la production des cytokines⁷⁰¹⁻⁷⁰⁴. Enfin, elle favorise l'immunité adaptative en stimulant les réponses spécifiques des lymphocytes T et B^{705,706}. La voie IFN I se divise en plusieurs étapes : la détection virale et deux cascades de signalisation en amont et en aval de la sécrétion des IFN I, IFN- α et β . L'ultime objectif est d'induire l'expression des gènes stimulés par les interférons (ISG : Interferon-stimulated genes) qui codent pour des protéines nécessaires à la cellule pour entrer dans un état antiviral⁷⁰⁷.

A. Reconnaissance du pathogène

Les PRR (Pattern Recognition Receptors) sont des groupes de récepteurs spécifiques capables de reconnaître et d'interagir avec des motifs moléculaires associées aux pathogènes (PAMPs). Ils sont impliqués dans l'activation de la réponse IFN I. Leur activation provoque aussi

la mobilisation de l'immunité innée en enclenchant un processus inflammatoire qui pourra plus tard provoquer une réponse immunitaire adaptative. Les deux grandes familles TLRs (Toll-like receptors) et RLRs (RIG-I-like receptors) sont chargées de détecter les agents pathogènes, comme les virus et de promouvoir dans ce cas une réponse anti-virale immédiate. Les TLR sont très exprimés en surface ou dans les compartiments endosomaux des cellules présentatrices d'antigènes tels que les cellules dendritiques et les macrophages⁷⁰⁸. A l'inverse, les RLR sont des molécules de détection cytoplasmiques qui sont utilisées par toutes les cellules de l'organisme, notamment les cellules épithéliales, et qui reconnaissent le génome des virus à ARN⁷⁰⁹. D'autres familles de récepteurs ont été identifiées plus récemment, tels que les ALR (AIM2-like receptors) qui sont spécialisés dans la détection cytoplasmique des virus à ADN.

1) La famille des Toll-like receptors (TLRs)

Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires capable de reconnaître les motifs conservés des pathogènes. Des homologues des TLRs ont été retrouvés chez tous les êtres vivants et on distingue dix membres chez l'Homme, numérotés de 1 à 10. Les TLRs sont caractérisés par leur localisation membranaire (TLR1, 2, 4, 5 et 6) ou endosomale (TLR 3, 7, 8, 9 et 10) et par la reconnaissance de motifs variables.

En outre, les TLRs 1, 2, 4, 5 et 6 sont spécialisés dans la reconnaissance des motifs protéiques et lipidiques majoritairement bactériens (lipoprotéines, flagelline, Etc.) et les TLRs 3, 7, 8 et 9 interagissent avec les acides nucléiques (ADN et ARN simple et double brin). Tous les TLRs utilisent la molécule Myd88 comme adaptateur pour l'induction de leur signalisation à l'exception du TLR3 qui utilise l'adaptateur TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β)⁷⁰⁸.

2) Les récepteurs cytosoliques

a) Les RIG-I-like receptors (RLRs)

La famille des RLRs est spécialisée dans la reconnaissance des virus à ARN simple ou double brin. Elle est composée de trois membres, les hélicases RIG-I (retinoic acid inducible gene I), Mda5 (melanoma differentiation associated gene 5) et LGP2 (laboratory of genetics and physiology 2)⁷⁰⁹. Les protéines RIG-I et Mda5 possèdent au niveau de leur région N-

terminale deux domaines de recrutement et d'activation des caspases (CARDs : Caspase Recruitment Domains) essentiels à leur signalisation. Les trois hélicases ont en commun un domaine « DExD/H-box RNA helicase » qui leur confère une activité ATPase. Enfin, la région C-terminale (CTD : C Terminal Domain) ou domaine répresseur (RD : Repressor Domain) est nécessaire au maintien d'une conformation inactive de ces protéines jusqu'à fixation de l'ARN viral. L'expression des RLR est inductible par les interférons (IFN), permettant une boucle d'amplification paracrine et autocrine de la détection virale. Malgré une structure proche des hélicases RIG-I et Mda5, elles se distinguent par leur capacité à détecter différents acides nucléiques ^{710,711}.

RIG-I reconnaît préférentiellement les petites structures doubles brins de l'ARN (<300pb, paire de bases) avec des extrémités franches et un groupement triphosphate en 5'. Ce groupement favorise la discrimination des ARN de l'hôte et du virus. En effet, la présence de la coiffe en 5' sur les ARN messagers eucaryotes abroge la détection par RIG-I ^{712,713}. Il était supposé que RIG-I pouvait reconnaître aussi bien les ARN simples brins que les doubles brins. Il a cependant été montré plus tard que la région de l'ARN simple brin reconnue par RIG-I est une structure de repliement de l'ARN en forme d'épingle à cheveux à ses extrémités 3' et 5'. RIG-I reconnaît donc exclusivement les formes doubles brins de l'ARN ^{714,715}. Ces structures sont fréquemment rencontrées chez les virus à ARN simple brin tels que le virus de la grippe, le MV, le VSV et le Sendai virus ⁷¹⁶⁻⁷¹⁸. Lorsque la protéine RIG-I interagit avec l'ARN viral, elle subit des modifications conduisant à son activation complète. En effet, l'ubiquitine E3, Riplet et TRIM25 (Tripartite Motif-containing protein 25) vont catalyser la fixation de l'ubiquitine K63. RIG-I s'oligomérisse, forme le complexe « translocon » avec TRIM35 et la protéine chaperonne 14-3-3ε et va interagir avec la protéine adaptatrice MAVS (Mitochondrial antiviral-signaling protein) ⁷¹⁹⁻⁷²¹.

Actuellement, le mode de distinction du soi et du non soi par Mda5 n'est pas clair. Les premières études *in vivo* ont montré la capacité de Mda5 à reconnaître le long poly (I:C), homologue de l'ARN double brin, comme ligand favorable à l'induction de la voie IFN I. Cette propriété n'a pas été retrouvée chez RIG-I. Mda5 a donc été caractérisé comme capable de repérer spécifiquement les longs ARN doubles brins (>1000 pb) ⁷²². Les picornavirus, virus à ARN simple brin, ont aussi été décrits comme détectés par Mda5. Dans ce cas, ce sont les composés intermédiaires de réplication qui semblent être identifiés ⁷²³.

L'hélicase LGP2 détecte et fixe l'ARN double brin comme RIG-I et Mda5 mais l'absence du domaine CARD ne lui permet pas d'induire une signalisation IFN I. Son rôle est en revanche de moduler l'action des autres membres de la famille des RLR. Elle régule négativement RIG-I et améliore la signalisation de Mda5 d'une manière encore obscure ⁷¹⁰.

b) Les AIM2-like receptors (ALR)

Chez l'homme on répertorie plusieurs membres de la famille des ALRs tels qu'AIM2, IFI16, PYHIN1 et MNDA. Ces protéines sont caractérisées par un domaine de liaison à l'ADN et interagissent avec l'adaptateur STING (Stimulator of Interferon Genes). Une étude récente a cependant démontré que l'implication des ALRs dans l'activation de la réponse IFN n'est pas indispensable étant donné les phénomènes de redondance fonctionnelle des voies de détections ⁷²⁴⁻⁷²⁶. La protéine DAI (DNA-dependent Activator of IFN-regulatory factor) est aussi classée dans la famille des ALRs. Elle est activée au contact de l'ADN et stimule la voie IFN en recrutant les protéines TBK1 (TANK Binding Kinase 1) et IRF3 (Interferon Regulatory Factor 3) ⁷²⁷.

c) Autres détecteurs cytoplasmiques

Il existe un grand nombre d'autres détecteurs, tels que la polymérase III ⁷²⁸ et cGAS (cGAMP Synthase), impliqués dans la détection des ADN cytosoliques. Par exemple, cGAS en se liant à l'ADN va induire la synthèse d'un puissant activateur de la voie STING, cGAMP (cyclic Guanosine monophosphate-Adenosine Monophosphate) ⁷²⁹. Les protéines OASL en collaboration avec RIG-I ⁷³⁰ et la PKR (Protein Kinase R) ⁷³¹ ont été décrites comme des senseurs cytoplasmiques des ARNs. Cette liste de détecteurs cytoplasmiques n'est pas exhaustive et continuera probablement à s'agrandir dans les années à venir.

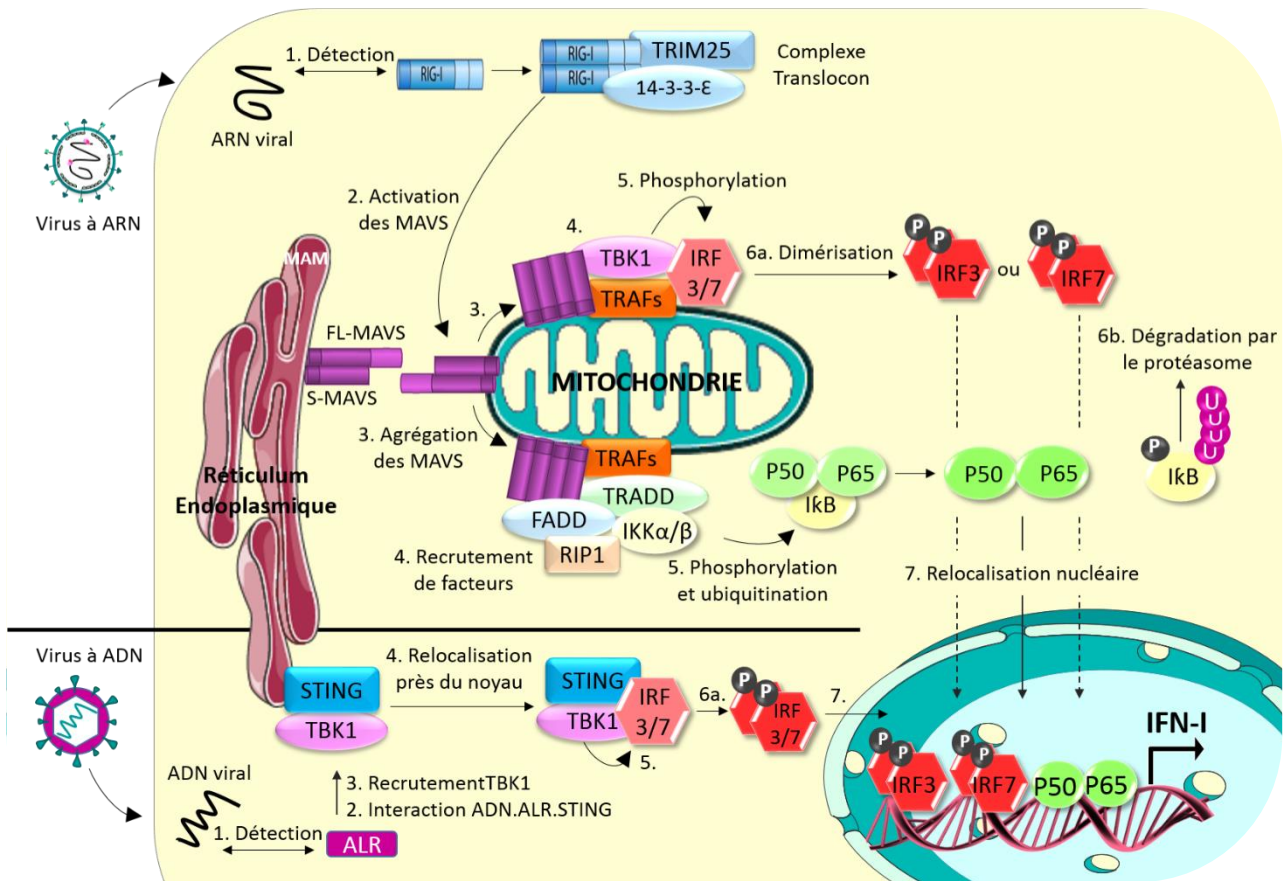


Figure 14. Signalisation MAVS et STING. Adapté de West et al, 2011, Nat Rev Immunol « Mitochondria in innate immune responses » et de Vazquez et al, 2015, J virol, « MAVS coordination of antiviral innate immunity »^{732,733} L'ARN viral est détecté par RIG-I qui s'oligomérisse, forme le complexe translocon et active les protéines MAVS qui s'agrègent à la membrane mitochondriale. Ensuite, le recrutement des protéines de la famille des TRAF et TBK1 permet la phosphorylation d'IRF3 et sa relocalisation nucléaire. En parallèle, le recrutement de TRAF6, TRADD, FADD, des kinases RIP1 et d'IKKα et IKKβ permet la phosphorylation et l'ubiquitination d'IκB suivi de la libération et de la relocalisation nucléaire du complexe P50/P53 (NF-κB). IRF3 et NF-κB induisent l'expression de l'IFN-β. Dans un second temps, IRF7 est exprimé par la cellule puis de manière similaire à IRF3 il va être phosphorylé, relocalisé au noyau et induire l'expression des IFN-α. L'ADN viral est détecté par les membres de la famille ALR, le complexe formé interagit avec STING qui recrute TBK1. STING et TBK1 sont relocalisés près de la membrane nucléaire pour phosphoryler IRF3 ou IRF7 puis induire l'expression des IFN-I.

B. Signalisations MAVS et STING

1) Signalisation MAVS

La protéine MAVS (Mitochondrial Antiviral-Signaling Protein, ou Cardif, IPS-1 ou VISA) est traduite en deux formes, la forme courte sMAVS et la forme longue FL-MAVS (Figure 14). Le rôle de régulation positive de la forme courte a été évoqué dans plusieurs études⁷³⁴. En absence de signal d'activation, l'adaptateur MAVS, qui fait le lien entre la mitochondrie et le sous domaine du réticulum endoplasmique appelé MAM (Mitochondria-Associated Membranes), est bloqué dans un état de repos par la protéine MFN2 (Mitofusin 2)⁷³⁵. Lors d'une signalisation induite par un virus à ARN, les détecteurs RIG-I (complexe translocon)⁷²⁰

ou Mda5 se fixent sur la protéine MAVS via leur domaine CARDS respectifs. L'engagement de MAVS conduit à son agrégation à la membrane mitochondriale résultant en une importante amplification du signal. La cascade d'activation des MAVS par Mda5 est peu claire mais est bien décrite avec RIG-I. En effet, le translocon permet les régulations positives de MAVS (phosphorylation et ubiquitination en position K63) provoquant son activation^{720,733,736}. MAVS peut alors recruter des protéines de la famille TRAF (TNF Receptor Associated Factors), la kinase TBK1 et IRF3 qui subit la phosphorylation nécessaire à l'activation du signal antiviral IFN I⁷³⁷⁻⁷³⁹. Parallèlement, MAVS recrute diverses molécules de signalisation dont TRAF6, TRADD (TNFR1-Associated Death Domain protein), FADD (FAS-Associated via Death Domain), les kinases RIP1 (Receptor-Interacting Protein 1), IKK α et IKK β (IKK : I κ B kinase) et active la voie NF- κ B impliquée dans l'induction de cytokines pro-inflammatoires et de la voie IFN I (Figure 14)⁷³². Enfin, une autre hypothèse intéressante propose que la localisation de MAVS dans les mitochondries induirait plutôt une signalisation IFN I tandis sa localisation au niveau des peroxysomes induirait plutôt des IFN de type III. Cette localisation différentielle nécessite cependant d'être confirmée par d'autres études⁷³³.

2) Signalisation STING

La découverte de la protéine adaptatrice STING est relativement récente puisqu'elle remonte à 2008. Cette protéine a pourtant un rôle crucial dans la signalisation IFN I induite par l'ADN⁷⁴⁰. STING est ancré dans le réticulum endoplasmique grâce à 4 domaines transmembranaires positionnés en N-terminal et possède un domaine carboxy-terminal (CTD : C-Terminal Domain) situé dans le cytosol. Les détecteurs des ADNs viraux tels que les ALRs cités précédemment se fixent sur STING qui lui-même se fixe sur l'ADN via son domaine CTD. Cette double fixation engendre une association de la kinase TBK1 à STING près de la mitochondrie et entraîne une relocalisation du complexe au niveau de la membrane nucléaire^{740,741}. STING va servir alors de lien entre la kinase TBK1 et la protéine IRF3 et permettre sa phosphorylation⁷⁴². Dans la majorité des cas, l'axe de signalisation STING-TBK1-IRF3 est utilisé par la cellule en réponse à la détection des ADNs cytosoliques (Figure 14). Enfin, il a été montré que le rôle de STING sur la voie NF- κ B en réponse à l'ADN est dépendant de TBK1, bien que les mécanismes de transduction du signal restent à clarifier⁷⁴³.

C. Relocalisation nucléaire des facteurs de transcription

Les signalisations MAVS et STING induites par l'ARN et l'ADN viral, respectivement, convergent vers 3 facteurs de transcription : les protéines IRF3, IRF7 et le complexe NF- κ B composé des protéines p50 et P65 (ou RELA). Ces protéines sont des régulateurs essentiels à l'expression des IFN de type I qui se divise généralement en deux étapes. Dans un premier temps IRF3 et NF- κ B induisent l'expression de l'IFN- β qui participe à une boucle d'amplification de la voie de manière dépendante d'IRF7 et conduit dans un second temps à une production simultanée de l'IFN- β et des IFN- α ^{705,744}.

La protéine IRF3 et le complexe NF- κ B sont exprimés constitutivement dans le cytosol cellulaire en absence de stimulation. Lorsque la signalisation antivirale se met en place, IRF3 subit des phosphorylations de résidus sérine en C-terminal par la kinase TBK1 tandis que l'inhibiteur I κ B se décroche du complexe NF- κ B pour être dégradé par le protéasome. Ces modifications provoquent la dimérisation d'IRF3 et la translocation nucléaire des deux complexes IFR3 et NF- κ B. Le facteur de transcription IRF3 forme l'holocomplexe en se liant au co-activateur CBP ou p300. NF- κ B et l'holocomplexe se fixent alors sur les séquences d'ADN cible, le promoteur du gène *IFNB1* et d'autres gènes ⁷⁴⁵⁻⁷⁴⁹.

En coopération avec le complexe ATF-2 (Activating Transcription Factor 2) et c-Jun (ou AP-1 : Activator Protein 1), NF- κ B et l'holocomplexe forment l'enhanceosome qui améliore la stabilité et permet une transcription plus efficace ⁷⁵⁰. Le promoteur de l'IFN- β est composé de quatre domaines de régulation (PRDI à IV, PRD : Positive Regulatory Domain). PRDII et PRDIV sont reconnu par NF- κ B et le complexe ATF-2/c-Jun respectivement tandis que les domaines PRDI et PRDIII sont reconnus par l'homodimère IRF3 ^{744,751-753}. Une puissante expression du gène *IFNB1* induit la première vague de signalisation IFN qui conduit à l'expression de nombreux gènes dont *IRF7*. En effet, contrairement à IRF3, la protéine IRF7 est très peu exprimée dans la plupart des cellules. Son expression va être fortement induite dans un deuxième temps lors de la phase tardive de la voie IFN I. Son activation est similaire à celle d'IRF3, néanmoins, IRF7 a la capacité d'activer l'expression du gène *IFNB1* mais aussi de tous les gènes codant les IFN- α en se liant aux domaines PRDI/III et PRDI-like, respectivement, provoquant une réponse antivirale amplifiée (Figure 15) ^{744,754-756}.

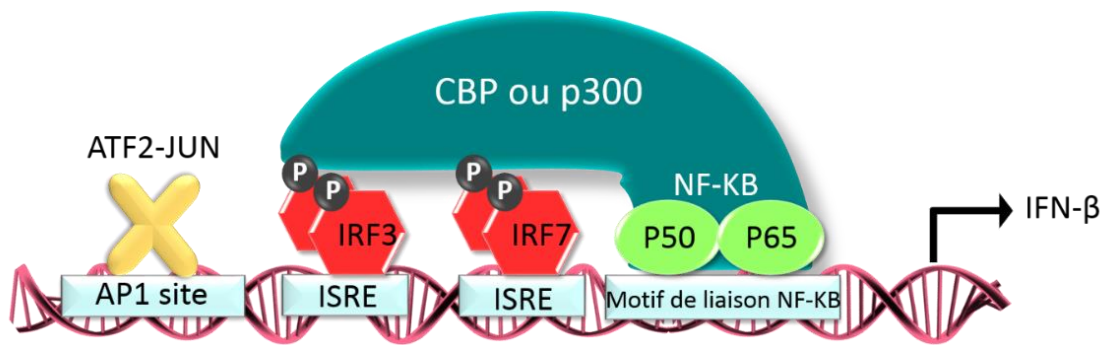


Figure 15. Enhanceosome et facteurs de transcription impliqués. Adapté de Honda et al, 2006 Nature, « Interactions between interferon-regulatory factor 3 and nuclear factor-KB » ⁷⁵⁰.

D. Gènes interférons de type I et leurs récepteurs

La découverte des IFN, cytokines pléiotropiques, remonte à 1957 par les Dr. A Isaacs et J Lindenmann ⁷⁵⁷. Chez l'Homme, Les IFN I sont composé des sous-types principaux IFN- α et IFN- β et des sous-types IFN- ϵ , IFN- κ et IFN- ω . La transcription des IFN de type I s'initie après la fixation de l'enhanceosome, puis les ARN messagers sont acheminés dans le cytoplasme pour être traduits en protéines. Celles-ci vont ensuite être sécrétées dans le milieu extracellulaire et agir de façon autocrine sur la cellule infectée et paracrine sur les cellules avoisinantes en se fixant sur le récepteur IFNAR (Interferon Alpha And Beta Receptor), un hétérodimère composé de la sous unité IFNAR1 et IFNAR2 ⁷⁰⁷. Les gènes codant les IFN I sont localisés sur la région p21.3 du bras court du chromosome 9. Cette partie se concentrera sur les sous types principaux et leurs récepteurs (Figure 16).

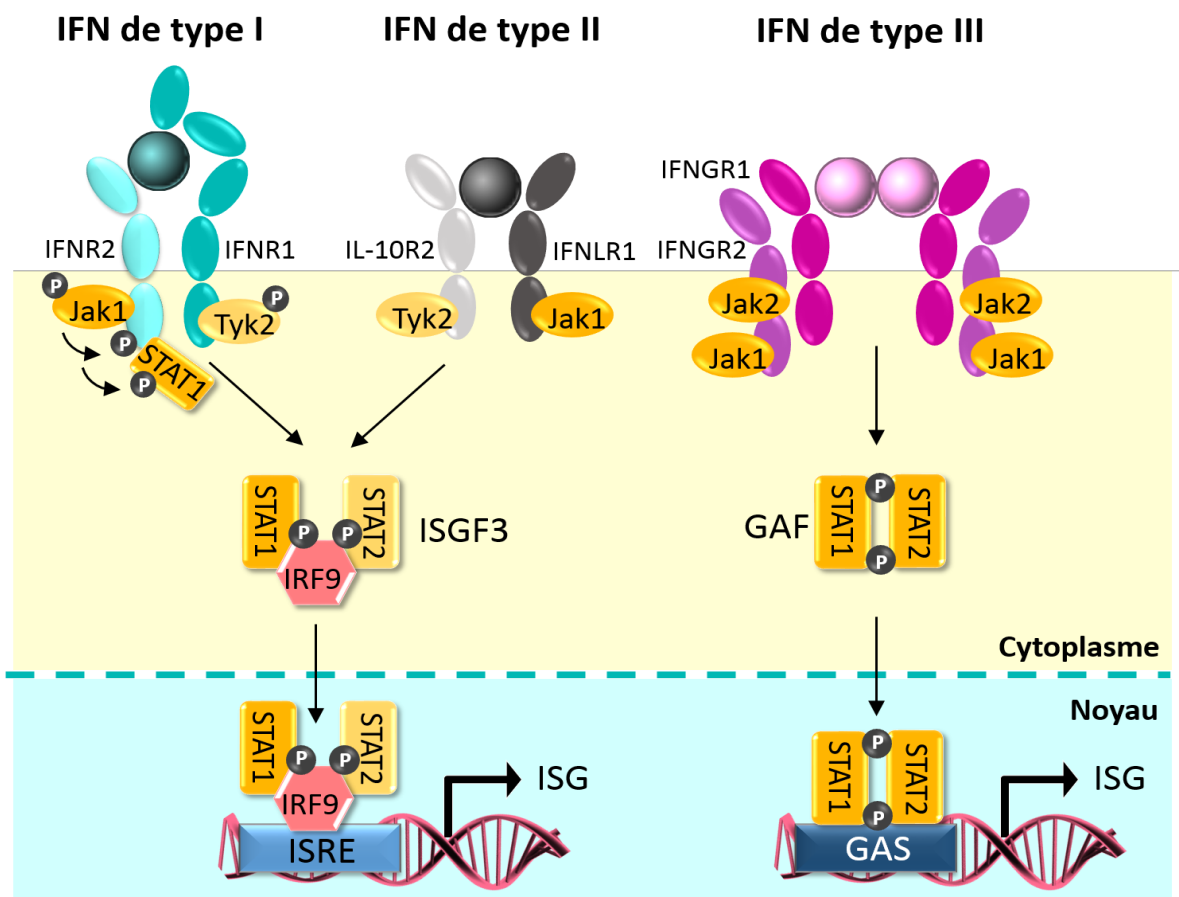


Figure 16. Signalisations IFNAR, IL-10R/IFNLR1 et IFNGR. Adapté de Schneider et al, 2014, ARI, « Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses »⁷⁰⁷.

La liaison des IFN I et III à leur récepteur respectif déclenche la phosphorylation de JAK1 (Janus Kinase 1) et TYK2 (Tyrosine-Protein Kinase 2) qui phosphorylent à leur tour la partie intracellulaire des récepteurs. STAT1 et 2 sont recrutés, s'hétérodimèrisent, se fixent à IRF9 pour former le complexe ISGF3 (Interferon-Stimulated Gene Factor 3).

La liaison d'IFN II à son récepteur conduit à la phosphorylation de JAK1 et JAK2, la transphosphorylation du récepteur et le recrutement et phosphorylation de STAT1. Les homodimères STAT1 phosphorylés forment le facteur d'activation IFN-γ (GAF : Gamma interferon Activation Factor).

Les complexes ISGF3 et GAF relocalisent au noyau pour induire l'expression des ISG (Interferon stimulated gene).

1) Interféron bêta

La protéine IFN-β est exprimée par la quasi-totalité des cellules de notre organisme et plus particulièrement par les fibroblastes. Elle est la première protéine de la signalisation IFN exprimée par la cellule en réponse à un virus. L'IFN-β est codé par un gène unique (*IFNB1*) de 851pb sans région intronique, qui lui confère une transcription et une traduction courte afin d'obtenir une protéine fonctionnelle rapidement⁷⁵⁸.

2) Interféron alpha

Les protéines IFN- α peuvent être elles-aussi exprimées dans toutes les cellules. Toutefois, les cellules dendritiques plasmacytoïdes, cellules immunitaires spécialisées dans la réponse anti-virale, sont les plus grandes productrices d'IFN- α ⁷⁵⁹. Il en existe 13 sous-types chez l'homme codant pour 13 isoformes nommées IFN- α 1, 2, 4 à 8, 10, 13, 14, 16, 17 et 21, dont la plus active est l'IFN- α 2 ⁷⁵⁸.

3) Récepteur IFNAR

Le récepteur des IFN de type I est un hétérodimère ubiquitaire composé d'IFNAR1 et IFNAR2, de 110-120kDa et 90-100kDa, respectivement. Les gènes sont localisés sur le bras long du chromosome 21 ^{760,761}. Les récepteurs IFNAR1 et 2 sont caractérisés par la présence d'un domaine extracellulaire comportant des domaines fibronectine III D1 et D2 pour IFNAR2 et SD1 à SD4 pour IFNAR1. Le domaine intracellulaire d'IFNAR1 comporte quatre résidus tyrosine et un domaine de fixation pour la tyrosine kinase Janus nommée TYK2 (Tyrosine-Protein Kinase 2). IFNAR2 possède des domaines de fixation de la kinase Janus appelée JAK1 (Janus Kinase 1) et de STAT2 ^{762,763}. La sous unité IFNAR2 est indispensable à la fixation des IFN et à la dimérisation avec IFNAR1. Les deux sous unités sont donc requises dans la signalisation ⁷⁶⁴⁻⁷⁶⁶.

E. Signalisation IFNAR

La signalisation IFNAR est particulièrement rapide du fait de la présence de tous les acteurs avant la moindre stimulation. La fixation des IFN suivie de la dimérisation des sous-unités IFNAR1 et 2 permet le rapprochement des kinases Janus (TYK2 et JAK1) ainsi que leur auto-activation et l'activation d'IFNAR1 et 2 ⁷⁶⁷⁻⁷⁶⁹. En effet, JAK1 phosphoryle IFNAR1 sur la tyrosine 466, recrute STAT2 via son domaine SH2 (Src Homology region 2) ⁷⁷⁰ et le phosphoryle sur la tyrosine 690. La présence de STAT2 attire STAT1 qui sera à son tour phosphorylé sur sa tyrosine 701 par TYK2. Une hétérodimérisation de STAT1 et STAT2 conduit à un changement de conformation laissant apparaître un signal de re-localisation nucléaire ⁷⁷¹. Une fois dans le noyau, STAT1 et STAT2 s'associent avec IRF9 (ou p48) et forment le complexe ISGF3 (Interferon-Stimulated Gene Factor 3) ⁷⁷². La signalisation de la voie IFN I se termine par

l'induction de l'expression d'un groupe de gènes appelés ISG (Interferon-Stimulated Genes) suite à la fixation d'ISGF3 sur les séquences régulatrices ISRE (IFN-Stimulated Regulatory Elements) ⁷⁰⁷.

F. Gènes stimulés par les interférons

L'objectif final de la réponse IFN I est l'expression d'un ensemble d'ISG composé de plus de 350 gènes selon la liste répertoriée dans l'étude réalisée par le Dr. Schoggins en 2014 ⁷⁷³. Les ISG agissent à différents stades du cycle répliatif du virus et mettent la cellule dans un état antiviral efficace contre les pathogènes. Certains ISG ont des actions directes sur le virus pour bloquer l'entrée, la transcription, la traduction ou la réplication du génome viral, l'assemblage ou la sortie. D'autres ISG ont des effets antiviraux indirects. Parmi ceux-ci, on retrouve notamment la plupart des acteurs de la voie IFN I qui subissent une boucle d'amplification, ainsi que des protéines impliquées dans des voies pro-apoptotiques ⁷⁰⁷. De plus, les ISG ont une large activité contre plusieurs virus ou ciblent des classes spécifiques de virus (Figure 17). Dans l'étude du Dr. Schoggins en 2014, l'activité de plus de 350 gènes a été criblée sur 7 familles de virus avec 14 virus distincts dont le MV. Ils ont identifiés 47 gènes capables d'inhiber au moins un virus et 25 gènes qui les stimulent. Étonnamment, le MV a été un des rares virus qui n'a pas permis d'identifier un ISG essentiel pour l'inhibition de plus 50% de son infectivité, suggérant que ce virus nécessite l'action combinée de plusieurs ISG pour stopper sa progression ⁷⁷³. De nombreuses d'études ont identifié l'activité fonctionnelle de certains ISG. Toutefois, un effort considérable reste à faire pour identifier les fonctions d'un grand nombre d'entre eux. Une meilleure compréhension de leur rôle est indispensable aussi bien pour comprendre et cibler des virus pathogènes, que pour améliorer l'activité oncolytique de certains virus ^{774,775}.

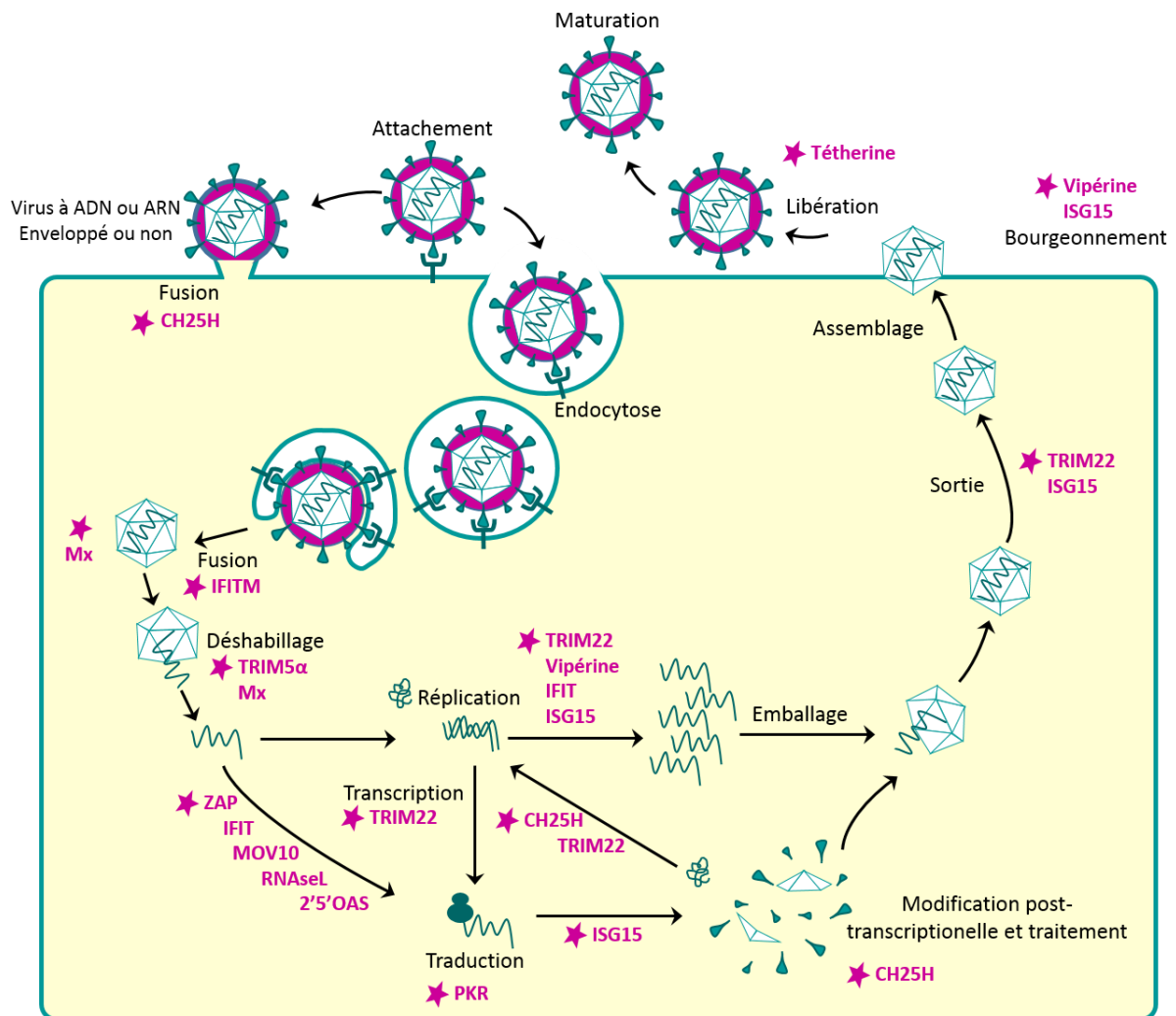


Figure 17. Fonctions antivirales des ISG dans le cycle des virus. Adapté de Schneider et al, 2014, ARI, « Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses »⁷⁰⁷.

1) Famille Mx

Les protéines MX1 et MX2 (MX : MX Dynamin Like GTPase) sont des GTPases de la famille des dynamines. Leur expression et donc leur activité sont contrôlées par les voies des IFN I et III et sont caractérisées comme de potentiel marqueur d'une réponse antivirale^{256,776}. Les protéines de cette famille possèdent 3 domaines distincts. Le domaine GTPase en N-terminal fixe et hydrolyse le GTP, le domaine central reconnaît le virus cible et permet l'oligomérisation des protéines Mx entre elles et le domaine effecteurs GTPases, en C-terminal, contient le motif leucine zipper nécessaire au repliement de la molécule pour la rendre enzymatiquement active. Des études structurales ont montré que les protéines Mx sont sous forme de tétramères qui s'oligomérisent en structure « ring-like » indispensable à l'activité GTPase^{777,778}. L'absence de ces structures circulaires engendre la perte de réponse

contre le virus de la grippe de type A ⁷⁷⁹. La protéine Mx1 intervient précocement en séquestrant la nucléocapside après l'entrée du virus pour stopper sa progression vers son site de réplication et le rediriger vers un processus de dégradation ^{780,781}. Son action a été évaluée chez un grand nombre de virus dont le MV et n'est pas claire pour ce dernier ⁷⁸²⁻⁷⁸⁴. La protéine Mx2 cible fortement le rétrovirus HIV-1 en inhibant la fonction de la capsid dans l'entrée dans le noyau ⁷⁸⁵.

2) Famille IFITM

La famille IFITM (Interferon-Induced Transmembrane) est composée de quatre membres (IFITM1, 2, 3 et 5) qui rentrent en jeu dans plusieurs étapes précoces du cycle viral. Ils bloquent l'entrée du virus en perturbant la fusion membranaire par des changements de courbure et de fluidité de la membrane cellulaire. De plus, ils interviennent au niveau de l'endosome après endocytose du virus, ce qui implique une spécificité d'action contre certains virus en fonction de leur mécanisme d'entrée. L'inhibition de cette étape n'est cependant pas encore claire, mais une hypothèse a été posée sur la potentielle action des IFITMs sur l'acidification endosomale. Enfin, il a été évoqué un effet inhibiteur d'IFITM1 sur la réplication du VIH-1 (Virus de l'Immunodéficience Humaine 1) ⁷⁸⁶.

3) ISG15

L'ISG15 a largement été étudié pour ses propriétés d'ISGylation. Il s'agit d'une modification régulatrice post-traductionnelle d'une protéine cible par la fixation d'un ISG analogue de l'ubiquitine tels que l'ISG15. L'ISGylation impacte les protéines virales et certaines protéines de la cellule hôte. On retrouve par exemple des effets positifs sur le facteur de transcription IRF3 qui voit sa stabilité augmenter par l'ISGylation car elle le protège de la polyubiquitination. A l'inverse, la cycline D1 perd de son activité dans le cycle cellulaire après ISGylation. Plusieurs études se sont penchées sur la compréhension de son mode d'action *in vivo*. Des souris doubles négatives pour ISG15 sont devenues plus sensibles au VSV, à l'HSV-1, au virus Sendaï et à la grippe tandis qu'un rôle protecteur pour le VV a été observé. ISG15 module l'activité de la voie IFN I par son action positive sur IRF3 comme décrit précédemment mais à l'inverse, régule négativement RIG-I. Son effet antiviral via les protéines cellulaires n'est

donc pas clair. Néanmoins, l'existence de protéines virales qui ciblent l'ISG15 est bien connue dans la littérature telle que les protéines NS1 de la grippe et NS5A de l'hépatite C par exemple. Enfin, il a été rapporté que l'ISG15 sécrété par les cellules immunitaires stimule la production d'IFN- γ par les NK et les LT. D'autres ISG ayant les mêmes propriétés d'ISGylation que ISG15, ainsi que leur rôle sont probablement encore à identifier.

4) Famille IFIT

La famille IFIT (Interferon Induced proteins with Tetratricopeptide repeats) comporte quatre membres chez l'Homme nommés IFIT1 (ISG56), IFIT2 (ISG54), IFIT3 (ISG60), IFIT4 (ISG58). Les gènes codant pour ces protéines ne sont pas initialement exprimés dans la majorité des cellules mais vont rapidement être induit après infection. Les protéines IFIT sont impliquées dans une multitude de processus visant à bloquer le virus ⁷⁸⁷. Leur fonction majeure est l'inhibition de la traduction des ARN messagers viraux au niveau de plusieurs étapes. IFIT1 et IFIT2 empêchent les facteurs eIF3c et eIF3e (Eukaryotic Initiation Factor 3) de se fixer au complexe ternaire eIF2-GTP-Met-ARNt et de former les complexes 43S et 48S au cours de l'initiation de la traduction ^{788,789}. D'autres expériences réalisées avec le VSV, le virus de la grippe et le RVFV (Rift Valley fever virus) ont montré que IFIT1 sert de capteur des triphosphates en 5' localisés sur les ARN messagers viraux et IFIT2 et IFIT3 interagissent ensuite pour apporter la fonction inhibitrice. De plus, une expression ectopique individuelle de chaque IFIT *in vitro* n'a pas été suffisante pour retrouver une inhibition efficace laissant supposer que la présence du complexe IFIT1, IFIT2 et IFIT3 est nécessaire ⁷⁹⁰. Néanmoins, plusieurs résultats *in vivo* dans des modèles de souris *ifit1*^{-/-} infectées par le VSV, ont été contradictoires avec une mortalité augmentée dans certain cas et parfois non ^{790,791}. D'autres études *in vivo* semblent donc nécessaires pour éclaircir le rôle précis de ces molécules.

5) Protéine PKR

La protéine PKR (Protein Kinase R) est maintenue à l'état inactif dans le cytoplasme et peut être activée soit de manière directe par l'ARN double brin viral soit indirectement par des cytokines, le stress oxydatif ou par les TLRs. Une homodimérisation suivie d'une autophosphorylation va alors lui permettre d'être totalement active ⁷⁹². La PKR joue un rôle

dans un grand nombre de mécanismes dont l'inhibition de la synthèse protéique du virus et de la cellule infectée. En effet, elle phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction eIF2a et par conséquent bloque la traduction ⁷⁹³. Sa capacité à détecter les ARN doubles brins lui permet d'induire la voie IFN I et joue donc un rôle dans son auto-amplification. Il a notamment été évoqué son effet direct dans la stabilisation transcriptionnelle des IFN I et la régulation post-transcriptionnelle de l'IFN- β ⁷⁹⁴. D'autre part, elle est aussi impliquée dans l'activation des voies NF- κ B, MAPK et JNK (c-Jun N-terminal Kinase) ⁷⁹⁵.

6) OAS/RNaseL

L'OAS (Oligoadenylate Synthetase) détecte l'ARN double brin étranger, s'oligomérisse en tétramère et conduit à la synthèse de 2'-5'-oligoadénylates. Ces messagers intracellulaires ont pour objectif d'activer spécifiquement l'endoribonucléase RNaseL présente dans le cytoplasme en état de latence. L'enzyme active va alors cliver de manière aveugle les ARN qu'elle rencontre, qu'ils soient d'origine virale ou cellulaire. Cette action aura pour effet une diminution drastique de la synthèse protéique et une activation des senseurs cytoplasmiques RIG-I et Mda5. Ainsi, comme la PKR, l'OAS est impliquée dans la boucle d'amplification de la voie IFN I. De plus, la RNaseL dégrade l'inhibiteur I κ B, ce qui a pour conséquence l'induction de la voie de signalisation NF- κ B ⁷⁹⁶⁻⁷⁹⁸.

7) RSAD2

La protéine RSAD2 (Radical SAM Domain-containing 2), également connue sous le nom de vipérine, a été décrite comme inhibant l'enzyme impliquée dans la biosynthèse des isoprénoïdes, la FPP (Farnesyl Diphosphate Synthase) nécessaire au bourgeonnement du VIH-1 et de la grippe de type A ⁷⁹⁹. D'autres études l'ont aussi caractérisée comme inhibiteur de la réplication virale du virus de l'hépatite C ⁸⁰⁰. Le cytomégalovirus, quant-à-lui, stimule l'expression de RSAD2 et le détourne de ses fonctions. RSAD2 va alors agir positivement sur la sortie virale en perturbant le cytosquelette cellulaire par une diminution de la production d'ATP ⁸⁰¹.

8) BST2

Le gène *BST2* (Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2) code la protéine tethérine qui inhibe le bourgeonnement. Elle a notamment été décrite comme séquestrant le VIH-I dans le cytoplasme. Néanmoins, les virus ont évolué en développant des stratégies d'évasions, tels que le VIH-I avec la protéine Vpu et le KSHV (Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus) avec l'ubiquitine ligase K5 qui catalysent l'ubiquitination de la tethérine résultant en sa dégradation⁸⁰².

II. Mécanisme de désensibilisation de la voie IFN de type I

Après une stimulation, la voie IFN I rentre dans un état de désensibilisation pendant plusieurs jours⁸⁰³. Cette régulation négative est essentielle pour équilibrer les effets bénéfiques antiviraux et éviter les effets pro-inflammatoires préjudiciables. En effet, une sur-activation anormale de cette signalisation se manifeste par des maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux et le syndrome de Sjögren⁸⁰⁴. La désensibilisation cellulaire intrinsèque peut être due à l'internalisation suivie de la dégradation du récepteur IFNAR⁸⁰⁵. La SUMOylation par l'action de protéines inhibitrices des STAT (PIAS : Protein Inhibitor of Activated STAT) est un processus proche de l'ubiquitinylation qui entraîne, là encore, l'inhibition de la signalisation IFN⁸⁰⁶. D'autre part, certains ISG régulent négativement la réponse IFN en aval d'IFNAR. C'est le cas des protéines SOCS (Suppressor Of Cytokine Signalling) qui interagissent avec les tyrosines phosphorylées sur IFNAR et sur les kinases JAK et les entraînent dans la voie de dégradation du protéasome⁸⁰⁷. Enfin, l'ISG USP18 (Ubiquitin Specific Peptidase 18) possède un rôle majeur de désensibilisation. USP18 diminue l'effet de l'ISG15 et inhibe la fixation de JAK1⁸⁰⁸. La protéine USP18 n'a cependant pas montré d'effet sur la voie IFN de type III et semble limitée à la signalisation IFN- α et pas IFN- β ⁸⁰⁹. Plusieurs tyrosines phosphatases sont aussi impliquées dans la déphosphorylation des JAK et des STAT⁸¹⁰⁻⁸¹².

III. Les voies interférons de type II et III

La voie IFN I est la voie la plus connue et la plus étudiée dans l'induction des ISG. Néanmoins, les voies IFN de type II et III sont elles aussi capables d'activer l'expression de ces gènes. Ces trois types d'IFN se distinguent selon leur structure, le type et la localisation de leur récepteur, leur voie de signalisation intracellulaire et le profil des ISG qu'ils régulent. L'IFN- γ est le seul IFN de type II et utilise le récepteur IFNGR1/IFNGR2 (IFNGR : Interferon gamma receptor 1). La production d'IFN- γ est limitée aux cellules du système immunitaire telles que les NK activées et les LT. En revanche, presque toutes les cellules y répondent en raison d'une expression ubiquitaire du récepteur ⁸¹³. L'IFN- γ intervient dans la régulation des cellules immunitaires et des réponses innées et adaptatives. L'IFN- γ agit notamment sur la présentation d'antigènes en augmentant l'expression des molécules HLA de classe I et en induisant l'expression des molécules HLA de classe II par les cellules non immunitaires. La signalisation IFNGR diffère de celle des IFN I puisqu'elle passe par l'homodimérisation de STAT1, appelée complexe GAF (Gamma interferon Activation Factor).

L'IFN de type III inclut quatre membres, l'IFNL1 (IL-29), l'IFNL2 (IL-28A), l'IFNL3 (IL-28B) et l'IFNL4 ⁸¹⁴⁻⁸¹⁶. Leur récepteur est composé d'une sous-unité IFNLR1 unique au IFN de type III et restreint aux cellules épithéliales, et d'une sous-unité IL-10R2 commune à la famille des cytokines IL-10 ⁸¹⁶. La signalisation IFN de type III est similaire à celle de l'IFN I et entraîne l'expression de plusieurs ISG en commun (MX1, IRF9, IFIT3, RSAD2, TNFSF10, CXCL10 : C-X-C motif chemokine 10 etc.). Les IFN I diffèrent néanmoins des IFN de type III par leur niveau d'induction des ISG bien plus élevé (Figure 16) ⁸¹⁷.

IV. Induction des ISG par les voies non canoniques

De manière générale, l'induction de la transcription des ISG se fait classiquement par les IFN comme décrit précédemment. Néanmoins, une grande hétérogénéité des voies non-canoniques induisant les ISG de manière dépendante ou indépendante des IFN a été étudiée. Ainsi, il a été montré une coopération de la voie TNF ou la voie Rac1/p38 avec la réponse IFN I. En effet, le TNF- α bloque la dégradation d'IFNAR2 ⁸¹⁸ et stimule certains ISG ⁸¹⁹ et la kinase p38 contribue à la régulation transcriptionnelle des ISG dépendant des IFN ⁸²⁰. Le complexe ISGF3 a été identifié sous plusieurs formes avec STAT1 et/ou STAT2 complexé seul à IRF9,

parfois sous une forme phosphorylée et parfois non ^{821,822}. STAT5 peut lui aussi intervenir pour engendrer un signal qui implique non pas IRF9 mais la protéine CrkL (CRK Like Proto-Oncogene) et agissent comme facteur de transcription ⁸²³.

Par ailleurs, les IRF, facteurs de transcription des IFN I, ont été reconnus comme capables d'induire directement l'expression d'ISG précocement afin de bloquer au plus vite la progression virale. En 2001, l'équipe du Dr. Mossman montre que des particules du HSV-1 incapables d'exprimer des nouveaux gènes viraux induisent un état antiviral avec une augmentation d'ISG indépendante des IFN I ⁸²⁴. La même année une équipe Japonaise démontre, par des expériences de KO et d'expression ectopique d'IRF activés lors d'une infection par le virus Newcastle Disease, une induction directe des ISG IP-10 (CXCL10), GBP, ISG15 et ISG54 (IFIT-2) par IRF3 mais pas par IRF1 et IRF7. A l'inverse, un autre groupe de gènes (codant OAS, PKR et IRF7) dépendait totalement d'ISGF3 donc par conséquent des IFN ⁸²⁵. Les virus HSV-1, VV, VSV NDV et le Sendai virus ont tous montré une induction d'un état antiviral par la production de l'ISG56 nécessitant IRF3 malgré l'absence de production d'IFN ⁸²⁶. Ensuite, un profil transcriptionnel par micro-array chez un mutant d'IRF3 constitutivement actif fut réalisé en présence d'anticorps neutralisant contre l'IFN- α et - β . Sur les 8556 gènes étudiés, sept ISG ont été identifiés. On retrouvait notamment les ISG OAS, GBP, p44, ISG15, ISG54 (IFIT-2), ISG56 (IFIT-1) et ISG60 (IFIT-3) ⁸²⁷. En 2011 et en 2016, l'équipe du Dr. Mossman a montré que la perturbation de la membrane cellulaire par l'entrée d'un virus induit une réponse antivirale dépendante d'IRF3 mais pas des IFN I. En effet, l'utilisation de la protéine FAST du réovirus (Fusion-Associated Small Transmembrane protein) qui perturbe les membranes cellulaires induisait une forte expression d'ISG56 qui est supprimée par la perte d'IRF3 ⁸²⁸. Par ailleurs, la reconnaissance des génomes viraux par les récepteurs d'acides nucléiques cytosoliques ainsi que la signalisation du calcium associée à la perturbation membranaire entraînent l'activation de STING et d'IRF3 ⁸²⁹. Au vu des nombreuses publications citées ici et bien d'autres, IRF3 apparaît donc comme un nœud central dans les réponses au stress des cellules hôtes. Dans une moindre mesure, IRF1 a lui aussi été décrit comme capable d'induire certains ISG ⁸³⁰ tandis qu'IRF2 réprime son effet ⁸³¹. De plus, IRF1 augmente le niveau de STAT1 phosphorylé et agit par la voie JAK/STAT pour amplifier les ISG ⁸³².

V. Réponse antivirale cellulaire et immunothérapie oncolytique

A. Défauts des réponses antivirales cellulaires spécifiques au cancer

Les réponses protectrices antivirales innées, telle que la réponse IFN I, sont initiés par les cellules infectées par un virus afin de limiter la progression virale. Elles peuvent donc être un frein majeur à l'utilisation de virus oncolytiques pour cibler les cellules cancéreuses. Ces réponses sont cependant incompatibles avec un développement tumoral de par leurs fonctions anti-prolifératives, anti-angiogéniques et pro-apoptotiques⁸³³. Par conséquent, des altérations de ces réponses sont fréquemment rencontrées dans les cellules cancéreuses. On retrouve notamment l'épissage alternatif d'IRF3 abrogeant ses fonctions⁸³⁴, la perte homozygote de la région p21 du chromosome 9 portant le cluster des gènes IFN I⁸³⁵⁻⁸³⁷, la mutation ou sous-expression de STAT1⁸³⁸ et la perte d'IRF9/p48⁸³⁹. Ainsi, les virus oncolytiques vont tirer partis de ces défauts pour se propager efficacement dans le tissu tumoral. Les cellules saines sont quant à elles protégées grâce à l'intégrité de leurs défenses antivirales.

B. Échappement viral à l'immunité cellulaire

Au cours de l'évolution, les virus ont développé de nombreuses stratégies immunomodulatrices pour échapper ou réprimer l'immunité innée (tableau 3). Chez le MV, la protéine V est considérée comme l'acteur majeur de l'inhibition de la voie IFN et intervient à plusieurs niveaux⁸⁴⁰. Elle interfère avec les senseurs cytoplasmiques Mda5 et LGP2 (Laboratory of Genetics and Physiology 2)^{841 842} et se fixe au facteur de transcription IFR7⁸⁴³ et au récepteur IFNAR1⁸⁴⁴. Elle inhibe aussi la phosphorylation de STAT1⁸⁴⁵ et STAT2⁸⁴⁶ empêchant leur relocalisation nucléaire et interagit avec IRF9 pour bloquer la formation du complexe ISGF3⁸⁴⁷. La protéine C du MV joue aussi un rôle dans le blocage de la réponse IFN I. Elle interfère efficacement avec l'activité du promoteur IFN- β ⁸⁴⁸, antagonise le récepteur IFNAR1⁸⁴⁴ et a aussi la capacité de bloquer les signalisations STAT1/2^{845,849}. La protéine C a également été décrite comme jouant un rôle anti-apoptotique important pour ralentir la mort cellulaire²⁴¹. Enfin, les protéines P et N du MV, le cofacteur de la polymérase et les

nucléoprotéines virales, ont aussi été évoquées comme étant des inhibiteurs des STAT1 et 2^{845,849}. Notre équipe a montré que la souche atténuée Schwarz du MV est sensible à IFN I, contrairement à la souche sauvage, ce qui s'explique par les mutations survenues notamment sur la protéine V lors du processus d'atténuation^{245,850,851} et de la présence de particules virales défectives interférentes détectables par RIG-I et Mda-5⁸⁵².

Le VSV est un virus particulièrement sensible aux IFN I. La protéine de la matrice (M) est divisée en 3 sous-types et a un rôle majeur et très diversifié dans l'infection, le cycle réplcatif et l'effet cytopathique du VSV. Le sous-type M1 de la souche sauvage séquestre les nouveaux ARN messagers dans le noyau et empêche de manière indirecte la mise en place d'une réponse IFN I complète. La souche oncolytique VSV Δ 51, précédemment citée, code une protéine M mutée qui limite donc la réplication aux cellules tumorales avec une voie IFN I déficiente^{853,854}.

Le VV et le HSV³²⁵ sont bien plus complexes que le MV et le VSV et possèdent des attirails similaires très complets pour stopper efficacement les réponses cellulaires antivirales. Ils produisent notamment des inhibiteurs des signalisations TLR, RLR, NF- κ B et IRF3⁸⁵⁵, des cytokines (IFN- α , β et γ , l'IL-1 β , le TNF- α , etc.)⁸⁵⁶, de quelques ISG (OAS PKR, RSAD2, etc.)^{857,855} et de l'apoptose⁸⁵⁸. Concernant l'adénovirus, les gènes de la région précoce E1, E2 et E3 sont majoritairement impliqués dans le combat contre les réponses antivirales de l'hôte. Ainsi, les processus de mort cellulaire, de réponses IFN (inhibiteurs de STAT1, STAT2) et de signalisation NF- κ B sont rapidement contrôlés après l'entrée du virus.

Signalisation ou protéine ciblée	MV	VSV	VV	HSV	AdV
Signalisation RLR	V	-	A46R ; A52R	Us3 ; Us11	-
Signalisation TLR	-	-	-	UL36	-
Signalisation IRF3 et/ou IFR7	V	-	N1L	Us3 ; VP16 ; VP24 ; ICP0 ; ICP27	-
Signalisation NF-κB	-	-	N1L	Us3 ; VP16 ; ICP0 ; UL42	E3
IFN-α et/ou β et/ou γ	C	-	B18R ; B8R	-	-
Récepteur IFNAR	V ; C	-	-	-	-
Signalisation STAT1 et/ou STAT2	V ; C ; P ; N	M1	-	VP16 ; ICP27	E1A
IRF9	V	-	-	-	-
PKR ; OAS	-	-	E3L ; K3L	Us11 ; γ34.5	E1 ; E2 ; E3
RSAD2 ; ZAP ; tétherine	-	-	-	UL41	-
IFI16	-	-	-	ICP0	-
<i>Cytokines</i> : IL-8	-	-	-	Us3	-
IL-18	-	-	C12L	-	-
IL-1 β	-	-	B15R	-	-
TNF-α	-	-	A53R	-	-
Chimiokines	-	-	B29R ; C23L	-	-
Apoptose (caspases)	C	M1	B22R ; B13R ; F1L	Us5 ; ICP6	E1B ; E3
Synthèse protéiques	V ; C	M1	-	-	-

Tableau 3. Protéines du virus de la rougeole (MV), de la vaccine (VV), de la stomatite vésiculaire (VSV), de l'herpès (HSV) et de l'adénovirus (AdV) impliquées dans l'échappement à la réponse antivirale ^{325,855}.

Conclusion partie III

Le système immunitaire cellulaire joue un rôle clé dans l'initiation des réponses immunitaires antivirales chez l'Homme et le contrôle de la progression virale. Elle peut par conséquent être un frein à l'immunothérapie oncolytique. Par exemple, la réplication du virus de la rougeole oncolytique est particulièrement sensible à la voie IFN I. Néanmoins les cellules tumorales, dont le mésothéliome pleural malin sont fréquemment porteuses de déficiences dans les signalisations de l'immunité cellulaire afin d'être invisible au système immunitaire. L'immunothérapie oncolytique tire avantage de ces aberrations pour que les OV infectent préférentiellement des cellules cancéreuses et épargnent les cellules saines. Cependant, des études ont montré que malgré une voie IFN I déficiente chez certaines cellules tumorales, la réponse cellulaire se développe tout de même mais partiellement. La caractérisation des réponses innées des cellules tumorales face aux virus oncolytiques dans le mésothéliome pleural malin est donc indispensable.

CONTEXTE

&

OBJECTIFS de THÈSE

L'immunothérapie oncolytique est basée sur des virus oncolytiques (OV) qui ont la capacité de se répliquer et de tuer préférentiellement les cellules cancéreuses sans endommager les tissus normaux. La mort induite par les OV est généralement très immunogène ce qui stimule une réponse immunitaire antitumorale et provoque des infiltrats lymphocytaires dans les tumeurs. Le mésothéliome pleural malin (MPM) est un cancer rare et très agressif résistant aux traitements conventionnels. Les stratégies émergentes telles que l'immunothérapie oncolytique sont donc attendues avec espoir pour ce cancer incurable.

L'équipe du Dr. M Grégoire, en collaboration avec le Dr. F Tangy de l'Institut Pasteur, évalue les propriétés oncolytiques et immunostimulatrices de la souche vaccinale Schwarz du virus de la rougeole (MV) pour le traitement du MPM. Le MV oncolytique a démontré son efficacité en clinique contre plusieurs cancers dont le myélome multiple et l'ovaire et les résultats précliniques *in vivo* et *in vitro* obtenus contre le MPM sont encourageants. Récemment, le Dr. Grégoire et le Dr. Tangy ont fondé une start up à l'Institut Pasteur, Oncovita, afin de promouvoir le développement d'un essai clinique pour le traitement du MPM.

Dans ce contexte ma thèse a comportée trois objectifs. Le premier objectif était d'identifier les défauts de réponse interféron de type I (IFN I) présents dans les cellules tumorales de MPM qui les rendent sensibles à l'activité oncolytique du MV et de déterminer les conséquences de ces défauts sur leur réponse au virus. Le second objectif consistait à étudier l'activité oncolytique d'un virus de la vaccine modifié VVTK-RR- contre le MPM *in vitro* et *in vivo*. Le troisième objectif de ma thèse était d'étudier les effets de plusieurs virus oncolytiques sur la présentation de l'antigène de tumeur NY-ESO-1 par la voie HLA de classe II des cellules tumorales de mélanome.

✓ **Identification des défauts de réponse IFN de type I et de leurs conséquences dans le mésothéliome pleural malin.**

Les travaux du Dr. C Achard, une ancienne étudiante en thèse de notre équipe, ont montré que 70% des lignées humaines de MPM (15/22) sont sensibles à l'effet oncolytique du MV et permettent sa répllication efficace ²⁵⁶. A l'inverse, 4 types de cellules saines et 7 lignées de MPM n'étaient pas permissives à la répllication virale. Dans la littérature, il était décrit que l'activité oncolytique du MV dépend de la surexpression de son récepteur à la surface des cellules tumorales ⁸⁵⁹. Bien qu'une majorité des lignées de MPM surexprime le CD46 par

rapport aux cellules saines, aucune corrélation entre le niveau d'expression de CD46 et la sensibilité des lignées tumorales n'a été établie.

Notre attention s'est alors portée sur la réponse antivirale IFN I des cellules tumorales. Ainsi par une étude de l'expression des ARN de différents membres de la voie IFN I (senseurs RIG-I et Mda5, les IFN- α et - β , et l'ISG MX1), Le Dr. C. Achard a montré que les cellules saines et les lignées de MPM résistantes au MV possèdent une réponse IFN I fonctionnelle. A l'inverse, 11 lignées sensibles sur 15 présentent des défauts de réponse IFN I par une absence d'expression des IFN I et de l'ISG Mx1 en présence du virus. Enfin, 4 lignées parmi les 15 sensibles faisaient exception car elles développent une réponse IFN I qui semble complète mais ne parviennent pas à inhiber la réplication du MV.

Dans ce contexte, le premier objectif de ma thèse était d'identifier les défauts de réponse IFN I dans les lignées de MPM sensibles au MV et de caractériser les réponses cellulaires induites par le virus malgré cette voie IFN I déficiente.

✓ Etude de l'activité oncolytique d'un virus de la vaccine modifié VVTK-RR- contre le mésothéliome pleural malin.

Récemment, nous nous sommes intéressé à un autre OV en collaboration avec Transgene, une société de biotechnologie française : le VVTK-RR-. Il s'agit d'un virus de la vaccine dont les gènes de la thymidine kinase (*TK*) et de la ribonucléotide réductase (*RR*) ont été délétés. Ce virus ne va infecter et tuer que les cellules tumorales car ce sont les seules cellules qui présentent assez d'activité *TK* et *RR* permettant la réplication virale. Le VVTK-RR- est très proche du VV JX594 qui est actuellement entré en essai clinique de phase III pour le traitement du cancer du foie.

Ainsi, le deuxième objectif de ma thèse a été d'étudier, avec Joëlle Nader, une étudiante en thèse de notre équipe, la sensibilité de lignées de MPM au virus oncolytique de la vaccine VVTK-RR- *in vitro* et *in vivo*.

✓ Etude des effets des virus oncolytiques sur la présentation de l'antigène de tumeur NY-ESO-1 par la voie HLA de classe II des cellules tumorales de mélanome.

Notre équipe a étudié les effets du MV sur la réponse immunitaire antitumorale. Nous avons montré que la mort immunogène des cellules tumorales induites par le MV est capable de provoquer la maturation des cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques (DC) myéloïdes et plasmacytoïdes ^{149,150}. Ces cellules sont alors capables de présenter à des lymphocytes T CD8+ les antigènes de tumeurs capturés suite à la lyse des cellules tumorales pour induire une réponse T cytotoxique contre la tumeur. Le MV et les cellules tumorales infectées par le MV sont donc très efficaces pour activer les DC ce qui favorise la phase d'initiation de la réponse antitumorale. Plus récemment, l'équipe a montré que, au contact du MV, ces différents types de DC acquièrent des capacités cytotoxiques par l'expression de la molécule TRAIL. Ces travaux ont donc pour la première fois permis d'évaluer le rôle d'un virus oncolytique sur les propriétés cytotoxiques des DC lors de la phase effectrice de la réponse immunitaire contre le cancer.

Récemment, notre équipe, en collaboration avec l'équipe des Dr. C Münz et M Gannagé, a décrit la voie suivie par l'antigène de tumeur NY-ESO-1 qui permet sa présentation par les molécules HLA de classe II à la surface des cellules tumorales ¹⁹³. Cet antigène est libéré dans l'environnement extracellulaire par les cellules tumorales qui l'expriment. Il est ensuite re-capturé dans la voie endo-lysosomale des cellules tumorales voisines qui vont alors pouvoir présenter des peptides issus de cette antigène par les molécules HLA de classe II.

Le troisième objectif de ma thèse a donc été de poursuivre l'étude de l'effet du MV sur la réponse immunitaire effectrice antitumorale. J'ai étudié quels sont les effets du MV sur la capacité des cellules tumorales à présenter l'antigène de tumeur NY-ESO-1 par les molécules HLA de classe II. En collaboration avec plusieurs équipes internationales, j'ai ensuite étendu cette étude à cinq autres virus oncolytiques : le virus de la vaccine, le virus de la stomatite vésiculaire, le virus de l'herpès, l'adénovirus et l'entérovirus.

RÉSULTATS

Article n°1: Frequent bi-allelic deletions of the type I interferon genes in pleural mesothelioma confer sensitivity to oncolytic measles virus

Tiphaine Delaunay, Carole Achard, Nicolas Boisgerault, Soizic Dutoit, Christophe Blanquart, Pierre-Joseph Royer, Stéphane Minvielle, Lisa Quetel, Clément Meiller, Didier Jean, Delphine Fradin, Laurent Cellerin, Frédéric Tangy, Marc Grégoire and Jean-François Fonteneau.

Introduction :

L'immunothérapie oncolytique est basée sur l'utilisation de virus oncolytiques (OV) non pathogènes qui se répliquent et tuent sélectivement les cellules tumorales sans nuire au tissu sain. Les OV induisent également une mort cellulaire immunogène qui stimule la réponse immunitaire antitumorale. La réplication virale est souvent favorisée dans les tumeurs en raison des défauts acquis lors du développement tumoral. En effet, les voies apoptotiques ou antivirales, normalement utilisées pour contrôler la progression virale, sont souvent altérées dans les cellules cancéreuses.

Notre équipe a récemment montré que 70% des lignées humaines de Mésothéliome Pleural Malin (MPM) (15/22) sont sensibles à l'effet oncolytique de la souche vaccinale Schwartz du virus de la rougeole (MV : Measles Virus). A l'inverse, 4 types de cellules saines et les 7 lignées de MPM restantes ne sont pas permissives à la réplication virale. Dans cette étude, nous avons démontré que l'activité oncolytique du MV dépend des déficiences de la réponse antivirale interféron de type I (IFN I) dans les lignées de MPM sensibles.

Nous avons donc cherché à identifier les défauts de réponse IFN I dans les lignées de MPM sensibles au MV et caractérisé les conséquences sur la réponse des cellules tumorales au virus.

Méthodes :

Dans un premier temps, nous avons utilisé un inhibiteur des réponses IFN, le ruxolitinib, afin de confirmer l'implication de cette voie dans le contrôle de la réplication du MV. Nous avons ensuite vérifié la fonctionnalité de la signalisation IRF3 et NF- κ B par RT-qPCR et par microscopie confocale dans les cellules tumorales. Nous avons aussi étudié les délétions des gènes codant les IFN- α et - β et du gène suppresseur de tumeur *CDKN2A* par PCR

génomique et par une étude cytogénétique cytoscan d’Affymetrix sur notre biocollecion de MPM et celle du Dr. D Jean . De plus, la fréquence de ces délétions dans de nombreux cancers a été étudiée grâce à l’analyse de la banque de données publique «The Cancer Genome Atlas» (TCGA) disponible sur le site cbiportal.org.

Dans la deuxième partie de cette étude, nous avons analysé les conséquences du défaut de réponse IFN I le plus fréquemment retrouvé dans le MPM sur la réponse cellulaire au virus des lignées de MPM sensibles par une analyse transcriptomique. De plus, les voies de signalisation canoniques activées par le MV ont été identifiées par le logiciel d’analyse Ingenuity® Systems. Afin de confirmer les résultats de l’étude transcriptomique au niveau protéique, l’expression de plusieurs protéines a été étudiée par western blot.

Dans la dernière partie de cette étude, l’implication de la voie IFN de type III sur la réponse cellulaire des lignées de MPM sensibles au MV a été évaluée par traitement des cellules tumorales avec de l’IL-29 (IFNL1) ou par l’utilisation du ruxolitinib qui inhibe la signalisation des récepteurs aux IFN I et III.

Résultats :

Dans cette étude, nous avons tout d’abord confirmé que la voie IFN I bloque la réplication et l’activité oncolytique du MV dans les lignées de MPM. De plus, les signalisations IRF3 et NF- κ B induites par la détection du virus sont fonctionnelles dans toutes les lignées de MPM. Nous montrons ensuite que la réponse IFN I est défectueuse dans certaines lignées de MPM, le plus souvent en raison de délétions bi-alléliques des gènes codant les IFN I (IFN- α et - β). Ces délétions accompagnent la perte des deux copies du gène suppresseur de tumeur *CDKN2A* situé dans la même région p21.3 du chromosome 9. L’analyse d’autres cancers par le TCGA montre que la perte des gènes IFN I est fréquente dans les cancers où la délétion du gène *CDKN2A* est impliquée.

Nous avons ensuite montré que les lignées de MPM sensibles qui ont perdu les gènes codant les IFN- α et - β développent une réponse IFN I partielle en présence du MV, caractérisée par une faible expression d’une partie des gènes stimulés par les IFN (ISG, Interferon-Stimulated Genes). Par ailleurs, l’exposition de ces lignées à de l’IFN- α et - β exogènes induit une signalisation IFNAR complète et efficace avec forte expression de nombreux ISG. Nous avons ainsi établi une classification des ISG en deux groupes : les ISG strictement dépendants de la présence des IFN I et les ISG induits par le MV en absence des IFN I. L’expression

protéique de ces deux types d'ISG a également été confirmée par western blot. Par ailleurs, l'analyse de signalisations canoniques de nos données transcriptomiques met en évidence une réponse cellulaire pro-inflammatoire par les lignées sensibles exposées au MV, caractérisée par l'activation des voies de cytokines et par l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique. Ce type de réponse a été décrit comme étant caractéristique d'une mort cellulaire immunogène.

Enfin, nous avons démontré l'absence d'implication des IFN de type III dans l'induction des ISG non strictement dépendant des IFN I chez les lignées de MPM sensibles porteuses de délétions homozygotes codant les IFN- α et - β .

Conclusion :

Dans cette étude, nous avons identifié la perte homozygote des gènes codant les IFN- α et - β comme étant le défaut majeur de la réponse IFN I dans le MPM. Ces altérations ont aussi été retrouvées dans plusieurs cancers où la délétion bi-allélique du gène suppresseur de tumeur *CDKN2A* est fréquente. De plus, ces délétions sont responsables de la sensibilité de nombreuses lignées de MPM à la réplication et à l'activité oncolytique du MV. D'autre part, nous avons montré que ces lignées sensibles développent en réponse au MV une réponse IFN I partielle et faible avec l'expression d'une partie des ISG, et activent de voies de signalisation impliquées dans l'inflammation et la mort cellulaire immunogène. Nous sommes donc les premiers à établir un lien entre la perte des gènes codant les IFN I et la sensibilité des cellules tumorales à un virus oncolytique. Ensemble nos résultats suggèrent que la délétion homozygote des gènes codant les IFN I pourrait être un marqueur pronostic de la réponse à l'immunothérapie oncolytique et devrait être évaluée dans les essais cliniques.

FREQUENT BI-ALLELIC DELETIONS OF THE TYPE I INTERFERON GENES IN PLEURAL MESOTHELIOMA CONFER SENSITIVITY TO ONCOLYTIC MEASLES VIRUS

Tiphaine Delaunay^{1,2}, Carole Achard^{1,2}, Nicolas Boisgerault^{1,2}, Soizic Dutoit^{1,2}, Christophe Blanquart^{1,2}, Pierre-Joseph Royer³, Stéphane Minvielle¹, Lisa Quétel⁴, Clément Meiller⁴, Didier Jean⁴, Delphine Fradin^{1,2}, Laurent Cellierin⁵, Frédéric Tangy⁶, Marc Grégoire^{1,2} and Jean-François Fonteneau^{1,2}

¹ CRCINA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France

² Labex IGO, Immunology Graft Oncology, Nantes, France

³ INSERM UMRS1087, Institut du Thorax, Nantes, 44000, France

⁴ INSERM, UMR-1162, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Labex Immuno-oncology, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Institut Universitaire d'Hématologie, Paris, F-75000, France ; Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, F-93200, Saint-Denis, France

⁵ CHU de Nantes, Service de Pneumologie, Nantes, 44000, France

⁶ CNRS 3569, Institut Pasteur, Paris, 75015, France

Corresponding author: Jean-François FONTENEAU, INSERM U1232, CRCINA, Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes, 8 quai Moncousu, BP70721, 44007 Nantes cedex 1, France

Abstract

Oncolytic immunotherapy is based on the use of non-pathogenic replicative oncolytic viruses (OV) that infect and kill exclusively tumor cells. Recently, we showed that the spontaneous oncolytic activity of the Schwarz strain of measles virus (MV) against human malignant pleural mesothelioma (MPM) depends on defects in the antiviral type I interferon (IFN I) response in tumor cells. In this study, we identify the most frequent defect as the bi-allelic deletions of all fourteen IFN I genes (IFN- α and IFN- β) that is present in more than half of MV-sensitive MPM cell lines. These deletions occur with the bi-allelic deletion of the tumor suppressor gene *CDKN2A* also located in the 9p21.3 chromosome region. These deletions are found in many cancers according to the Cancer Genome Atlas (TCGA) database, such as glioblastoma. Therefore, the IFN I^{-/-} MPM cell lines develop a partial and weak IFN I response when they are exposed to the virus compared to normal cells and MV-resistant MPM cell lines. This response consists in the expression of a restricted number of IFN stimulated genes (ISG) that do not depend on the presence of IFN I. In addition, the IFN I^{-/-} MPM cell lines infected by MV also develop a pro-inflammatory response associated with a stress of the endoplasmic reticulum characteristic of immunogenic cell death. Thus our study emphasizes the link between bi-allelic deletions of IFN I encoding genes and *CDKN2A* gene in cancer and sensitivity to MV oncolytic immunotherapy. It also suggests that this link should be monitored in clinical trials.

Key words: Oncolytic immunotherapy, Measles Viruses, Mesothelioma, Type I interferon, Interferon stimulated genes.

Introduction

Oncolytic immunotherapy is a developing strategy to treat cancer that is based on non-pathogenic replicative oncolytic viruses (OV) that exclusively replicate in and kill tumor cells (1). Indeed, viral replication is often favored in tumors due to the presence of an immunosuppressive environment and defects in several pathways in tumor cells such as apoptotic or antiviral pathways that are normally used to prevent viral replication (2). OV also stimulate the antitumor immune response by inducing immunogenic cell death of tumor cells and by modulating the tumor microenvironment (3,4).

Attenuated vaccine strains of measles virus (MV) such as Edmonston or Schwarz strains display a spontaneous oncolytic activity against numerous tumor cell types (5,6). These strains use the CD46 molecule as the major receptor to infect human cells, unlike the pathogenic strains that mainly use the CD150 molecule (7,8). Tumor cells often overexpress CD46 to escape complement-mediated cytotoxicity (9,10). This expression at high density favors the infection of tumor cells by attenuated MV (11).

We and others showed that the oncolytic activity of MV also depends on deficiencies of the antiviral type I interferon (IFN I) response in tumor cells (12-14). All nucleated cells are able to detect viral infection using intracytoplasmic pattern recognition receptors (15). In the case of MV, helicases such as RIG-I and MDA5 detect the viral RNA and send a signal to the nucleus via IRF3, NF-KB and, when expressed, IRF7. This signal induces the secretion of IFN I that protects infected and neighboring cells from viral replication. Indeed, exposure to IFN I induces the expression of hundreds of IFN-stimulated genes (ISG) in cells that express the IFN- α / β receptors (IFNAR). These ISG are directly or indirectly responsible for the antiviral

activity. Some of these ISG, such as ISG15 or ISG54 (IFIT1), can be directly activated in response to the virus via IRF3 without the need of IFN I, whereas others require IFN I and IFNAR signaling (15-17).

In a recent study, we reported that fifteen out of twenty-two human malignant pleural mesothelioma (MPM) cell lines were sensitive to Schwarz MV oncolytic activity due to defects of their antiviral IFN I response (12). Eleven out of these fifteen MPM cell lines were unable to secrete IFN I (IFN- β and IFN- α) in response to MV making them permissive to the viral replication that ended up killing them. However, these cell lines were able to control viral replication and to resist MV oncolytic activity if they were previously exposed to IFN I, suggesting that the defects of the IFN I response were located upstream of IFNAR. The seven others MPM cell lines out of twenty-two, and four types of healthy cells were able to produce type I IFN when exposed to MV and thus hinder viral replication and cell lysis.

In this study, we aimed at further identifying the defects of IFN I response present in MPM tumor cells, that make them sensitive to MV oncolytic activity. We also wanted to characterize their impacts on the cellular response to the virus. We show that the most frequent defect in MPM is the bi-allelic deletion of all genes encoding IFN I (IFN- α and IFN- β) that we found in eight out of the fifteen MV-sensitive MPM cell lines. We showed that, when exposed to MV, healthy cells and MV-resistant MPM cell lines mainly develop a complete IFN I response characterized by the expression of numerous ISG. On the opposite, the eight IFN I^{-/-} MPM cell lines develop a partial and weak IFN I response characterized by the expression of a restricted numbers of ISG that do not require the presence of IFN I. In addition, the IFN I^{-/-} MPM cell lines, contrary to the healthy cells and the MV-resistant MPM cell lines, develop a pro-inflammatory response associated with a stress of the endoplasmic reticulum typical of immunogenic

cell death. Thus, our study highlights that the frequent bi-allelic deletion of IFN I encoding genes in MPM, but also in other cancers where homozygous deletion of *CDKN2A* gene is a driver, represents a target that can be exploited by using OV such as Schwarz MV to induce immunogenic death of tumor cells.

Results

The IFN I response controls MV replication and oncolytic activity.

In a previous study, we demonstrated that the sensitivity of MPM cell lines to MV oncolytic activity depends on defects of the antiviral IFN I response in tumor cells (12). To confirm the role of the IFN I response on MV oncolytic activity we performed a first experiment where we exposed four MV-resistant MPM cell lines and two types of healthy cells (MESF mesothelial cells and CCD-19Lu fibroblast) to MV encoding the cherry fluorescent protein (MV-ch) in presence of the JAK1 and JAK2 inhibitor ruxolitinib to block the IFNAR signaling. We observed that healthy and MPM cells are resistant to MV-ch replication in absence of ruxolitinib (Figure 1A and 1B). This is probably due to the expression of ISG, as MV induce the expression of *MX1*, *TLR3* and *IRF7* in healthy and MV-resistant MPM cells (Figure 1C). However, adding ruxolitinib prevents ISG expression and releases the break on MV replication.

Thus, these results prove that MV replication and lytic activity are highly sensitive to a functional IFN I response and that defects in this signaling pathway in MPM tumor cells make them sensitive to the MV oncolytic activity.

IRF3 and NF-KB signaling is functional in MV-resistant and MV-sensitive MPM cell lines.

We then sought to identify the defects in the IFN I response present in MPM cell lines that are sensitive to the replication of MV. We determined if the IRF3, IRF7 and NF-KB proteins were functional in MV-sensitive MPM cell lines and allow the signal transduction from pattern recognition receptors (PRR) to the nucleus.

First, we assessed the expression of *IRF3*, *IRF7* and *RELA* genes that encode IRF3, IRF7 and p65, a sub-unit of NF-KB respectively (Figure 2A). *IRF3* and *RELA* are

constitutively expressed in all cell groups. *IRF7* is expressed at low basal level in MV-resistant MPM cell lines and barely detectable in healthy cells and MV-sensitive MPM cell lines. After exposure to MV, we observed that *IRF3* and *IRF7* expression is increased in healthy cells and MV-resistant MPM cell lines but is not induced in MV-sensitive MPM cell lines. On the opposite, *RELA* expression increases after MV infection in the three groups.

We then studied IRF3 and NF-KBp65 nuclear relocation 12h after MV exposure at high MOI by confocal microscopy. Without virus, IRF3 and p65 are not activated and are located mainly in the cytoplasm. After infection, we observed that both transcription factors relocate to the nucleus of MV-resistant MPM cells, as well as to the nucleus of MV-sensitive MPM cells (Figure 2B and 2C). There are no significant differences in the intensity of this nuclear relocation among the two groups (Figure 2D).

Altogether these results show that MV is well detected by MPM cell lines, even in the ones that failed to produce IFN I. Detection of MV is then followed by a signal that reaches the nucleus via the relocation of IRF3 and p65 transcription factors.

The most frequent defect of the IFN I response in MV-sensitive MPM cell lines is a bi-allelic deletion of the genes encoding IFN- α and IFN- β .

Since the PRR signaling is functional in MV-sensitive MPM cell lines, the defects are probably located in the nucleus at the level of genes encoding IFN I. We thus performed a genomic PCR on six MV-resistant and the fifteen MV-sensitive MPM cell lines to assess the presence of the *IFNB1* gene that encodes IFN- β (Figure 3A). Whereas six MV-resistant and seven MV-sensitive MPM cell lines have at least one copy of the *IFNB1* gene, eight out of the fifteen MV-sensitive MPM cell lines have a bi-

allelic deletion of the *IFNB1* gene: Meso 11, Meso 13, Meso 31, Meso 47, Meso76, Meso 96, Meso 163 and Meso 225.

The *IFNB1* gene is located on the chromosome 9 next to a cluster of thirteen genes encoding the IFN- α cytokines and close to the tumor suppressor gene *CDKN2A* that encodes p16^{INK4A} and p14^{ARF} (Figure 3B). In the next experiment, we measured the size of the deletions of the chromosome 9 region where the *IFNB1* gene is located. We performed a cytogenetic study by CytoscanTM that allowed to analyze the genome of the eight MPM cell lines that have lost the *IFNB1* gene and 4 MV-resistant MPM cell lines (Figure 3B). This technique covers the entire human genome with specific probes spaced by 1Kb in average. We observed in the MV-sensitive MPM cell lines that the bi-allelic deletion of *IFNB1* genes located at the 21.08Mb position encompasses all the genes encoding the IFN- α cytokines between the 21.17 and 21.44Mb positions and extend after the *CDKN2A* gene located at the 21.97Mb position. We also found that the four MV-resistant MPM cell lines have at least one copy of the gene encoding the IFN I cytokines. However, in three out of the four MV resistant tumor cell lines the two alleles of the *CDKN2A* gene are deleted. Only the cell line Meso61 conserved one copy of the *CDKN2A* gene.

Then we wanted to confirm the frequent bi-allelic deletion of the *CDKN2A* and *IFNB1* genes on another bio-collection of 80 short term-cultured MPM cell lines (Figure 3C). We found the bi-allelic deletion of the *CDKN2A* and *IFNB1* genes in 57 (71%) and 18 (23%) out of the 80 MPM cell lines respectively. 17 (30%) out of the 57 MPM cell lines that have lost the *CDKN2A* gene have also lost the *IFNB1* gene and 17 (94%) out of 18 MPM cell lines that have lost the *IFNB1* gene have also lost the *CDKN2A* gene (94%). One MPM cell lines, MPM_51, lost only the two copies of the *IFNB1* gene without losing a copy of the *CDKN2A* gene. Interestingly, *IFNB1* gene deletion was

significantly more frequent in MPM with a sarcomatoid component which are the most aggressive form of the disease (Fisher's exact test, p-value=0.0042), i.e. 14% of epithelioid MPM with a bi-allelic deletion, 45% of biphasic MPM and 50% of sarcomatoid/desmoplastic MPM.

Then we wanted to determine if other alterations of the IFN I pathway exist in MPM and to estimate their frequencies. Thus, we looked by the cbioportal.org website (<http://www.cbioportal.org>) in the TCGA database on eighty-seven MPM patients for alterations of *CDKN2A*, *IFNA2* and *IFNB1* genes, but also at several other genes that encodes protein implicated in the IFN I response (Figure 4A). We observed 43.8%, 18.4% and 9.2% of *CDKN2A*, *IFNA2* and *IFNB1* genes bi-allelic deletions respectively. There is no other alteration on these genes except one fusion for *CDKN2A*. The genes encoding the other proteins of IFN I response were rarely altered with two patients out of eighty-seven having a *STAT1* alteration and several patients having unique alteration either on *DDX58* (RIG I), *IFIH1* (MDA5), *STAT1*, *STAT2*, *JAK1* or *JAK2*. The alteration of *DDX58* and *IFIH1* were found in patients with IFN I genes deletions, whereas alterations of *STAT1*, *STAT2*, *JAK1* or *JAK2* were found in patients without IFN I genes deletions.

We then wanted to determine if these bi-allelic deletions are also frequent in other cancers. In TCGA, we looked at copy number alterations of *CDKN2A*, *IFNA2* and *IFNB1* genes. Mesothelioma is the second cancer with the most frequent *CDKN2A* bi-allelic deletion after glioblastoma multiforme (Figure 4B and 4C). Nine types of cancer, including melanoma (23.4%) and lung squamous cell carcinoma (26.1%), have a frequency of *CDKN2A* bi-allelic deletions superior to 20% that always correlate with lower frequencies of *IFNA2* and *IFNB1* bi-allelic deletions. The proportion of *CDKN2A*^{-/-} tumors that are also IFN I^{-/-} varied from one cancer to another. This proportion is very

high in pancreatic adenocarcinoma with more than half of *CDKN2A*^{-/-} tumors that are also *IFNA2*^{-/-}, whereas they are only 6.5% of *CDKN2A*^{-/-} *IFNA2*^{-/-} tumors in B cell lymphoma (Figure 4B). Finally, mutation of *CDKN2A* can be quite frequent in some cancers such as head and neck and pancreas cancers, while they are absent in others such as mesothelioma. Mutations of the IFN I genes, *IFNA2* and *IFNB1*, are rare in cancers and absent in MPM meaning that alteration of IFN I genes in cancer occurs mainly by homozygous deletions (Figure 4C).

Altogether these results show that bi-allelic deletion of IFN I genes are frequent in cancers where bi-allelic deletion of *CDKN2A* gene is a malignancy driver.

MPM cell lines that have lost IFN I genes develop a partial IFN I response and a proinflammatory program after exposure to MV.

We then wanted to characterize how the MPM cell lines that have lost IFN I encoding genes (*IFN I*^{-/-} MPM cell lines) respond to MV or exogenous IFN I (*IFN-α2a* and *IFN-β1a*) (Figure 5, Supplemental Figure 1). Thus we performed a transcriptomic analysis on four types of healthy primary cells (G1: CCD19Lu fibroblasts, HMVEC endothelial cells, MESF peritoneal mesothelial cells and CEB lung epithelial cells), on four MV-resistant MPM cell lines (G2: Meso4, Meso45, Meso61 and Meso173) and on the eight *IFN I*^{-/-} MPM cell lines (G3: Meso11, Meso13, Meso31, Meso47, Meso76, Meso96, Meso163 and Meso225).

First we analyzed the expression of genes encoding type I, II and III IFN and their receptors (Figure 5A-B). Constitutive expression of these genes was comparable in the three groups (Figure 5B). After 48h of MV exposure, expression of *IFNB1* gene is induced only in some healthy cells (G1) and in resistant MPM lines (G2) and absent from *IFN I*^{-/-} MPM cell lines (G3), whereas no expression of the IFNAs genes was

observed (Figure 5A). Expression of type III IFN genes (*IFNL1*, *IFNL2* and *IFNL3*) was strongly increased after exposition to MV in MPM cell lines (G2 and G3), but not in healthy cells (G1). We also observed that MV has no effect on expression of all IFN receptors. Furthermore, exposure of the different groups to exogenous IFN I has no effects on the expression of genes encoding type I, II and III IFN and their receptors.

Then, we investigated the expression of ISG by the three groups of cells in response to MV or type I IFN (Figure 5C-5D). When healthy cells (G1) and resistant MPM lines (G2) were exposed to MV, we observed the overexpression of a large panels of ISG (Figure 5C) which encode proteins with varied antiviral functions (24). In response to IFN I, the two groups of cells G1 and G2 expressed a similar set of ISG, although at a lower level. The MV resistant MPM cell lines (G2) develop a weaker response to MV and IFN I compared to healthy cells (G1), but the basal expression of these genes was often higher in G2 compared to G1 (Figure 5D), especially in Meso4 and to a lower extent Meso45 and Meso173 (Supplemental Figure 1). In contrast, the constitutive expression of these genes was lower in IFN I^{-/-} MPM cell lines (G3) compared to healthy cells. In response to MV, IFN I^{-/-} MPM cell lines (G3) express a limited set of genes, such as *RSAD2*, *IFIT1*, *OAS1* and *DDX58* compared to G1 and G2 (Figure 5C). The other genes such as *IFI35*, *IFIT1M*, *XAF1* and *TLR3* that are expressed in response to MV in G1 and G2, failed to be expressed in G3. However cell lines in G3 are able to express these genes after exposure to IFN I. Altogether these results show that IFN I^{-/-} MPM cell lines (G3) develop a partial IFN I response characterized by the expression of a limited set of ISG independently of IFN I expression that does not control MV replication. The other set of ISG requires IFN I and is not expressed in response to MV by IFN I^{-/-} MPM cell lines resulting in absence of MV replication control.

We also detected in G3 a particular set of ISG that were expressed mainly in response to MV, but that were not or weakly expressed in the two other groups of cells, such as *TNFAIP3*, *ATF3*, *IRF1* and *CCL2* (Figure 5C and 5D, lower panels). This result suggests that in absence of IFN I, IFN I^{-/-} MPM cell lines develop an alternative response to MV compared to the two other groups of cells. Thus, we analyzed the expression of genes other than ISG in the three groups in response to MV or exogenous IFN I (Supplemental Figure 2) and the transcriptomic results using Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity® Systems) to identify canonical cellular pathways that are induced by the virus in the three groups (Figure 5E). In G1 and G2, the virus mainly induced pathways that are typical of the IFN I response such as “Activation of IRF by Cytosolic Pattern Recognition Receptors” and “Interferon Signaling” pathways. In the G3, the IFN I response is also induced by MV, but we observed that numerous other pathways are activated in contrary to G1 and G2. These pathways can be summarized in two main types: an inflammatory response with activated pathways such as “TNFR2 Signaling”, “IL-17A Signaling in Gastric Cells”, “IL-6 Signaling”, “iNOS Signaling”, “Death Receptor Signaling” and “TNFR1 Signaling”; and an endoplasmic reticulum stress response characterized by activated pathway such as “Unfolded protein response”, “Protein Ubiquitination Pathway” and “Endoplasmic Reticulum Stress Pathway”.

Altogether these results show that before being lysed by MV, IFN I^{-/-} MPM cell lines engage transcriptionally in a partial, dysfunctional IFN I response characterized by the expression of a limited set of ISG. In addition, these cells develop an inflammatory response associated with an endoplasmic reticulum stress response.

Partial and weak expression of proteins encoded by ISG in IFN I^{-/-} MPM cell lines exposed to MV.

The transcriptomic study pointed out two types of ISG: the ISG that are transcribed in response to MV without the presence of IFN I and the ISG that are transcribed only in presence of IFN I. Thus in the next experiment we wanted to confirm the transcriptomic study by qRT-PCR and to measure by western-blot the level of proteins encoded by these two types of ISG (Figure 6).

First we analyzed four ISG that are expressed in response to MV without the presence of IFN I: *RSAD2* (Viperin), *IFIT1* (ISG56), *OAS1* and *DDX58* (RIG I). The expression of these ISG measured by RT-qPCR is increased by both, MV and IFN I, in IFN I^{-/-} MPM cell lines, confirming results from the transcriptomic study (Figure 6A). By western-blot, we observed a stronger basal expression of these proteins in MV-resistant MPM cell lines, especially Meso4 and Meso45, compared to IFN I^{-/-} MPM cell lines thereby suggesting a constitutively activated IFN I response in MV-resistant cells (Figure 6B). The expression of these proteins is upregulated after exposure to MV or IFN I in all MV-resistant MPM cell lines. In contrast, in IFN I^{-/-} MPM cell lines, MV induce only low levels of these proteins, whereas IFN I induce a higher expression similar to what is observed in MV-resistant cells.

We then confirmed by RT-qPCR that the expression of the ISG *XAF1*, *TLR3* and *STAT1* is only induced by IFN I in IFN I^{-/-} MPM cell lines and not by exposure to MV (Figure 6C). The proteins encoded by this IFN I-dependent ISG are also more constitutively expressed in MV-resistant MPM cell lines compared to IFN I^{-/-} MPM cell lines (Figure 6D). In MV-resistant MPM cell lines, MV as well as IFN I induce a strong expression of these proteins. In contrast, except Meso163, these proteins were not

induced by MV in IFN I^{-/-} MPM cell lines, whereas they are expressed at high level in response to IFN I.

Altogether these results show that IFN I^{-/-} MPM cell lines develop a weak and partial IFN I response at the protein level that is not sufficient to control MV replication. They also point out that two of the four MV-resistant MPM cell lines display a high constitutive level of proteins involved in the antiviral IFN I response.

Partial ISG expression induced by MV in IFN I^{-/-} MPM cell lines is not dependent of type III IFN

We wanted to determine whether type III IFN (IFN III) could be responsible for the expression of ISGs that are expressed by IFN I^{-/-} MPM cell lines after exposure to MV and are thus not strictly dependent on IFN I (Figure 7). To answer this question, we treated two MV-resistant and four IFN I^{-/-} MPM cell lines with IL-29 (IFNL1) or with ruxolitinib prior to MV infection. The expression of three ISGs (*RIG-I*, *IFIT1* and *CXCL-10*) that are not strictly dependent on IFN I was measured by RT-PCR. We observed that IL-29 failed to induce expression of these ISG in IFN I^{-/-} MPM cell lines and have a modest effect on their expression in MV-resistant MPM cell lines. In contrast, MV induce a strong expression of these ISG in all MPM cell lines and ruxolitinib that inhibits IFN III receptor signaling does not affect this expression in IFN I^{-/-} MPM cell lines.

These results demonstrate that expression of ISG that are independent of IFN I is not induced by IFN III in IFN I^{-/-} MPM cell lines.

Discussion

In this study, we demonstrated that the sensitivity of human MPM cells to the oncolytic activity of attenuated MV is due for half of the case to bi-allelic deletion of genes that encodes the IFN I cytokines, IFN- α and IFN- β . These deletions are associated with the bi-allelic deletion of the tumor suppressor gene *CDKN2A* also located in the 9p21.3 chromosome region. These co-deletions are also frequent in other cancers such as glioblastoma multiforme, melanoma or lung squamous cell carcinoma. We also showed that IFN I^{-/-} tumor cells that are sensitive to MV oncolytic activity are able to detect the virus which induces the relocation of IRF3 and NF-KB in the nucleus. Thus, before being lysed by MV, the IFN I^{-/-} tumor cells engage in a partial IFN I response characterized by the weak expression of a limited number of ISG compared to the panel of ISG that are expressed by healthy cells and MV-resistant MPM exposed to MV. The IFN I^{-/-} tumor cells also develop a pro-inflammatory response and endure a stress of the endoplasmic reticulum that are hallmarks of immunogenic cell death. Our work provides a better understanding of oncolytic activity of MV against MPM and other cancers. It also suggests that bi-allelic deletions of IFN I encoding genes may be an interesting marker to identify patients suitable for treatment by oncolytic immunotherapy. Furthermore, it would be interesting to monitor the IFN I gene copy number status in oncolytic immunotherapy clinical trials involving patients treated by OV to determine if the subgroup of patients with IFN I genes bi-allelic deletions are better responders.

Inactivation of the tumor suppressor gene *CDKN2A* is a key driver of mesothelioma (24,25). Frequent bi-allelic deletions of *CDKN2A* and also of the genes encoding IFN I have been described in MPM as soon as the nineties, but these studies mainly focused on the *CDKN2A* locus and the consequences of its inactivation (26,27).

In our study, we demonstrate that tumor cells displaying these bi-allelic deletions of IFN I genes can be targeted with oncolytic immunotherapy using IFN I-sensitive oncolytic viruses such as MV. We showed that 36% of the MPM cell lines (8/22) from our laboratory lost both copies of the *IFNB1* gene while they all lost the two copies of *CDKN2A* except Meso61 (data not shown). However, a majority of these MPM cell lines have more than ten passages *in vitro* and there could be a culture bias that makes *CDKN2A*^{-/-} MPM cell lines easier to establish. To get a more accurate estimation of the bi-allelic deletion frequency of the type I IFN genes in MPM, we measured this frequency in a series of eighty short term MPM cell lines. We found that 71% and 23% of these cell lines have lost the two copies of *CDKN2A* and *IFNB1* genes respectively. These percentages probably better reflect the reality as they correspond to the 60% to 74% of bi-allelic *CDKN2A* deletion found by fluorescence in situ hybridization (28-31). Interestingly *IFNB1* bi-allelic deletions are more frequent in mesothelioma cell lines with a sarcomatoid component (biphasic, sarcomatoid and desmoplastic MPM) with 47% of them harboring these deletions. In the TCGA public database, we found that 43.8% and 9.2% of MPM frozen tumor samples lost the two copies of *CDKN2A* and *IFNB1* genes respectively. However these results are likely underestimated, since they are obtained by high-throughput sequencing of tumor biopsies that contains healthy cells which can hide bi-allelic deletions only present in tumor cells as it was demonstrated for *BAP1* gene, also frequently deleted in MPM (32). The frequencies of bi-allelic deletions of *CDKN2A*, *IFNA2* and *IFNB1* genes in the other cancers are probably also underestimated for the same reason.

Among cancers that have lost IFN I genes, glioblastoma multiforme displays the highest frequency of these deletions (16.4% for *IFNB1* and 25.7% for *IFNA2*). This cancer is also one of the most studied for oncolytic immunotherapy with different

viruses such as herpes simplex, adenovirus and parvovirus (33,34). The bi-allelic deletion of IFN I genes may participate to the sensitivity of glioblastoma to oncolytic viruses. These deletions are also often found in melanoma and lung squamous cell carcinoma, two cancer types that we have been described as sensitive to oncolytic activity of MV in vitro and in vivo with human tumor xenograft models in immunodeficient mice (35,36). In the case of melanoma, we found that ten out of thirteen tumor cell lines were permissive to MV replication and thus sensitive to its oncolytic activity due to defects of the IFN I response (35). One of the MV-sensitive melanoma cell lines lost both copies of the *IFNB1* genes (data not shown). Thus our melanoma and present studies show that there are other defects of the type I IFN response that make tumor cells sensitive to MV beside the bi-allelic deletions of IFN I genes. For MPM, seven out of the fifteen MV-sensitive cell lines have at least one copy of the *IFNB1* gene. Three of them behave like IFN I^{-/-} MPM cell lines by failing to produce IFN I in response to MV, whereas the other four produce IFN I in response to MV, but failed to control viral replication (12). This converging selection of tumor cells toward inactivation of the IFN I response strongly suggests that the bi-allelic deletions of IFN I genes are not just a collateral damage of the loss of the *CDKN2A* locus, but bring additional advantages for tumor development.

Recently, the group of Evanthia Galanis reported in human tumor xenograft models in mice and by monitoring ten glioblastoma patients receiving MV oncolytic immunotherapy that the main transcriptional signature associated with resistance is the presence of a constitutive activation of the IFN I response in tumor cells (37). This gene signature can be used to predict which patients are likely to respond to MV oncolytic immunotherapy. We also found a constitutive activation of the type I IFN pathway in several MV-resistant MPM cell lines compared to healthy cells. As shown

by western-blot, these cell lines constitutively express a high level of proteins that are encoded by ISG. In addition, none of the eight IFN I^{-/-} MPM cell lines present a constitutive activation of the IFN I pathway. Given the high frequency of IFN I bi-allelic deletions in glioblastoma, it would be interesting to determine if there is any inverse correlation between the presence of these deletions and the IFN I gene signature observed by the group of Evantia Galanis (37). Indeed, the IFN I genes copy number status was recently analyzed in regard of anti-CTLA4 therapy and the bi-allelic deletion were reported as a resistance marker of this therapy (38).

In absence of IFN I genes, MPM cell lines exposed to MV develop a weak and partial IFN I response characterized by the expression of a limited number of ISG, such as *RSAD2*, *IFIT1*, *OAS1* and *DDX58*. They fail to express other ISG, such as *XAF1*, *TLR3*, *STAT1* and *Mx1* that need the presence of IFN I to be expressed. Furthermore, we showed that the expression of the first group of ISG does not depend on IFN I and III signaling. Several studies have reported the existence of this type of ISG that can directly be induced by a virus through IRF3/NF-Kb signaling independently of IFN I cytokine (15-17). We confirmed the work of Nakaya et al that identified four of these ISG: *ISG15*, *ISG54* (*IFIT2* in our study), *IP-10* (*CXCL10*) and *GBP* (*GBP4*, *GBP5* and *GBP1*) (17). They are also induced independently of IFN I in our transcriptomic analysis. Our results also confirmed the transcriptomic analysis performed by Grandvaux et al on a cell line with an inducible activated form of IRF3 (15). Like them, we found that IFN signaling is not necessary for expression of *ISG54* (*IFIT2* in our study), *ISG56* (*IFIT1*), *ISG60* (*IFIT3*), *Hepatitis C virus-associated microtubular aggregate 44-kDa protein* (*IFI44*), *GBP1*, *2'-5' OAS* (*OAS*) and *ISG15*. Their transcriptomic analysis was performed on 8,556 transcripts whereas we scanned 30,000 transcripts in our study, so we identified new ones such as *CXCL11*, *Mx2*,

DDX58 (RIG I) and *HERC5*. Furthermore we used eight different MPM cell lines to identify this group of ISG with statistical significance. This group of ISG that can be directly activated by IRF3 independently of IFN I and that is part of the early antiviral response is not sufficient to control replication of MV.

In addition to a weak and partial IFN I response, IFN I^{-/-} MPM cell lines also develop a pro-inflammatory response such as TNFR1/TNFR2, IL-17A, IL-6, iNOS signaling and a stress of the endoplasmic reticulum. It corroborates the *in vivo* model described by the group of Michael Diamond where *IFNAR^{-/-}* myeloid cells that are equivalent to the IFN I^{-/-} MPM cell lines in our study develop an exacerbated pro-inflammatory TNF- α response when infected by the West Nile virus (39). Our and their studies show that in absence of the IFN I signaling, the pro-inflammatory response is amplified. This pro-inflammatory response and the stress of the endoplasmic reticulum are probably part of the immunogenic cell death induced by MV replication. We and other showed that tumor cells lysed by MV are immunogenic by releasing tumor-associated antigens and danger signals from cellular or viral origins (40-46). All these signals induce the maturation of myeloid and plasmacytoid dendritic cells that are then able to cross-present antigens to T cells. Furthermore, in a phase I clinical trial of MV-based oncolytic immunotherapy in ovarian cancer, the group of Evanthia Galanis reported the induction of tumor-associated specific T cell response after injection of MV and clinical benefits for the patients (47).

To conclude, we think that the link between the bi-allelic deletion of genes encoding IFN I cytokines and sensitivity to oncolytic viruses should be more investigated in cancers where deletion of *CDKN2A* is a key driver and should be monitored in oncolytic immunotherapy clinical trials to determine if it can be a predictive marker.

Materials and methods

Cell culture

Human MPM cell lines (from Meso 4 to Meso 225) were established in our laboratory from pleural effusions collected by thoracocentesis, and genetically characterized (19). All patients gave their informed consent. All cell lines were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100U/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin and 2mM L-glutamine (all reagents from Gibco-Invitrogen) and cultured at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Normal peritoneal mesothelial cells MES-F were purchased from Tebu-bio, pulmonary fibroblasts CCD-19Lu from the ATCC-LGC Standards, and pulmonary endothelial cells HMVEC-L from Lonza. These cells were cultured in their specific media according to the manufacturers' recommendations. The bronchial epithelial cells were obtained and cultured as previously described (20). Cells were routinely checked for Mycoplasma contamination using the Plasmotest™ from InvivoGen.

The eighty MPM cell lines used to confirm the bi-allelic deletion of *IFNB1* gene were early passages of primary tumor cells established at INSERM U1162 laboratory, Paris, from surgical resection, pleural biopsies, or malignant pleural fluid of confirmed MPM cases, obtained from several French hospitals with patient's consents. Most of them were used in several previous studies showing their relevance to MPM primary tumors (21,22).

MV infection, IFN and inhibitor treatments

Live-attenuated Schwarz vaccine strain of measles virus (MV), MV recombinant for the enhanced green fluorescent protein (MV-eGFP) and MV recombinant for the cherry protein (MV-ch) were produced and purified as previously described (23).

Infection of cells with MV lasted 2h at 37°C. Viral inoculum was then replaced by fresh culture medium, unless otherwise indicated. Type I IFN treatment was performed by adding rhIFN- α 2a and rhIFN- β 1a (ImmunoTools) at 1,000IU/mL and type III treatment was done by adding rhIL-29 at 10ng/mL during 48h. The IFN I pathway was inhibited by ruxolitinib, a chemical inhibitor of janus-associated kinases (JAK1, JAK2 and JAK3), at 1 μ M three days before infection and added every days during the time of the experiment.

MV replication assay

Three days before infection, cells were seeded in 6-well plates at a density of 0.5×10^6 cells/well for the MPM cell lines with or without ruxolitinib. A day before infection, cells were seeded in 96-well plates, at a density of 10,000 cells/well. Infection was performed at multiplicity of infection of 1 (MOI 1) and fluorescence at 610nm was analyzed every day during 9 days using a ChemiDoc™ MP imaging system (Bio-Rad). Quantification was done with the Image Lab 4.1 Software (Bio-Rad) with the relative fluorescence corresponding to the ratio between the fluorescence measured in treated and non-treated cells.

Real-time RT-qPCR

MPM cell lines and healthy cells were seeded in 6, 12 or 24-well plates at a density of 0.5, 0.25 or 0.1×10^6 cells/well respectively. Then, cells were treated with Type I or III IFNs or ruxolitinib or/and infected with MV at MOI 1 during 48h or at MOI 10 during 12h. Total cell RNA was extracted using the Nucleospin® RNA II kit (Macherey-Nagel) and 0.5 μ g or 0.25 μ g total RNA was reverse transcribed using MMLV reverse transcriptase (Invitrogen). PCR reactions were conducted using QuantiTect

primer assays (Qiagen) and Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Gene expression was analyzed in treated or non-treated cells using QuantiTect primers pairs for *Mx1*, *TLR3*, *IRF7*, *STAT1*, *XAF1*, *IFIT1*, *DDX58 (RIG-I)*, *OAS1*, *IRF3*, *RELA (p65)* and *CXCL10*. Gene expression was expressed as relative expression compared to the expression of a housekeeping gene that encodes the human large ribosomal protein (*RPLPO*) and in fold change ($\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ gene non-treated} - Ct \text{ RPLPO non-treated}) - (Ct \text{ gene treated} - Ct \text{ RPLPO treated})$).

Genomic PCR

Genomic DNA was extracted with the Nucleospin® Blood kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. 250ng of genomic DNA was amplified according Phusion hot start II high fidelity DNA polymerase protocol (thermo scientific). The following primers were used: 5' 3' (forward) and 5' 3' (reverse) for *IFNB1* gene. A two steps cycling protocol was used with 1 cycle during 30s at 98°C, then 30 cycles of amplification 10s at 98 °C and 1min at 72 °C, following by a final extension 7min at 72°C.

For the eighty MPM cell lines of the validation series, genomic DNA was extracted using a standard isopropanol precipitation procedure. PCR was performed on genomic DNA (40 ng) using Phusion U Multiplex PCR according to the manufacturer's protocol (Thermo Scientific). Two couples of primers were used for the *IFNB1* gene: 5'-GGTCGTTTGCTTTCCTTTGC-3' (forward) and 5'-AGCAATTGTCCAGTCCCAGA-3' (reverse) and 5'-GCCTCCACAGATACCAAAATCA-3' (forward) and 5'-AAGCCTCCCATTCAATTGCC-3' (reverse). The following primers were used for *CDKN2A* : 5'-

CGGTAGGGACGGCAAGAGAG-3' (forward) and 5'-
CCTGTAGGACCTTCGGTGA-3' (reverse), and for *ARID1A* 5'-
TTCGCAACTGGACTTTCTCTC-3' (forward) and 5'-
TCAAATTAGCTAACTTCCAACC-3' (reverse). *IFNB1* was amplified by PCR including an initial denaturation step at 98°C for 30 s; 40 cycles including denaturation at 98°C for 10s, annealing at 60°C for 30s, extension at 72 °C for 30s; and a final extension at 72°C for 7min. *CDKN2A* and *ARID1A* genes were amplified by touchdown PCR including an initial denaturation step at 94°C for 15min; 40 cycles including denaturation at 94°C for 30s, annealing at different temperatures for 30s (2 cycles at 62°C, 2 at 61°C, 2 at 60°C, 3 at 59°C, 3 at 58°C, 4 at 57°C, 4 at 56°C, 5 at 55°C and 15 at 54°C), extension at 72°C for 1min; and a final extension at 72°C for 5min. PCR products were analyzed on a QIAxcel capillary electrophoresis system (Qiagen). *ARID1A* was used as a control to verify the quality of the amplification. *CDKN2A* status was checked based on previous available data; gene expression and mutational status on this gene (21). For association study with histologic types, the Fisher's exact test was performed using GraphPad Prism version 6 software.

Genomic analysis

Genomic DNA was extracted with Nucleospin® Blood kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. DNA (500 ng) was processed and hybridized to Affymetrix CytoScanHD Array according to the manufacturer's instructions (Affymetrix, Santa Clara, CA). The detection, determination and visualization of gains, losses were performed using Affymetrix Chromosome Analysis Suite software (ChAS v3.1.1.27).

Analysis of The Cancer Genome Atlas (TCGA) database

Available alteration data (copy number variation, mutation and fusion) for *CDKN2A*, *IFNA2*, *IFNB* and several genes that encodes protein implicated in the IFN I response were retrieved from cBioPortal, an online portal for accessing data from TCGA project (<http://www.cbioportal.org>).

Transcriptomic study

MPM cell lines and healthy cells were seeded in 6-well plates at a density of 0.5×10^6 cells/well. Then, cells were treated with Type I IFN or infected with MV at MOI 1 during 48h. Total cell RNA was extracted using the Nucleospin® RNA II kit (Macherey-Nagel). For each sample, a mix of an equal amount of RNA from three separate experiments was done. Transcriptome analysis was performed with Affymetrix human Gene 2.0 ST arrays according to the manufacturer's protocol. Briefly, total RNA (300 ng) was labeled and cRNA (antisens RNA) was synthesized using the Affymetrix WT cDNA Synthesis and Amplification Kit. After cleanup protocol, ssDNA (sense single stranded DNA) was synthesized, fragmented and labeled with biotin. Biotin-ssDNA was hybridized onto microarrays according to the manufacturer's instructions. After 16 h at 45 °C, microarrays were washed and stained using Affymetrix fluidics station 450 and scanned with an Affymetrix GeneArray scanner 3000 7G. Raw data were normalized using the Robust Multichip Algorithm (RMA) in Bioconductor R. Then all quality controls and statistics were performed using Partek GS® (version 6.6 Copyright© 2012 Partek Inc., St. Louis, MO, USA). To find differentially expressed genes, classical analysis of variance (ANOVA) was performed for each gene and pair wise Tukey's post hoc tests between groups. P-values and fold changes were used to

filter and select differentially expressed genes. Interaction, pathway and functional enrichment analyses were carried out with IPA (Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com, USA). All data obtained by microarray analysis have been submitted on GEO Omnibus site.

Western-blotting

MPM cell lines were seeded in 6-well plates at a density of 0.5×10^6 cells/well. Then, cells were treated with IFN I or infected with MV at MOI 1 during 48h. Cells were lysed in RIPA buffer containing a Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) and denatured at 95°C for 5min in Laemmli buffer with 10% β -mercaptoethanol. 20 μ g of proteins for cellular lysate were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis on 8% gels and transferred to PVDF membranes. Blots were incubated with anti-MX1 (clone M143, Dr. Georg Kochs, University Medical Center Freiburg, Germany), TLR3, STAT1, XAF-1, RIG-I, RSAD2, OAS1, IFIT-1 or actin primary monoclonal antibodies (Cell Signaling Technology), followed by incubation with HRP-coupled secondary antibodies (Jackson Immuno research). Proteins were revealed using Enhanced Chemiluminescence Detection ECL (BioRad).

Confocal microscopy

MPM cell lines were seeded in 8-well silicone cultivation chamber (IBIDI®) at a density of 0.5×10^5 cells/well and then infected with MV at MOI 10 during 12h. Cell membrane cells were labeled with WGA, a lectin marker, at 5 μ g/mL for 10min at room temperature. Cell were fixed with 4% paraformaldehyde for 20min at room temperature, cell and nuclear membranes were permeabilized for 5min at 20°C with absolute methanol and then blocked in PBS 0.1% BSA (Sigma Aldrich) at 4°C

overnight. Cells were incubated 5min in PBS 0.1% BSA 0.1% saponin (Sigma Aldrich) and then with anti-IRF3 and NF- κ B primary antibodies (Cell Signaling Technology) for 1h, followed by incubation with DyLight 488-coupled secondary antibodies (Life Technologies™) for 20min. Both were diluted in PBS 0.1% BSA 0.1% saponin and incubated at room temperature. Finally, nucleus were labeled by Hoescht 5 min at room temperature. Labeled cells were directly viewed with a confocal microscope (Nikon A1RSi). The images were recorded with NIS Element software (Version 3.6, Nikon) and processed with the software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA).

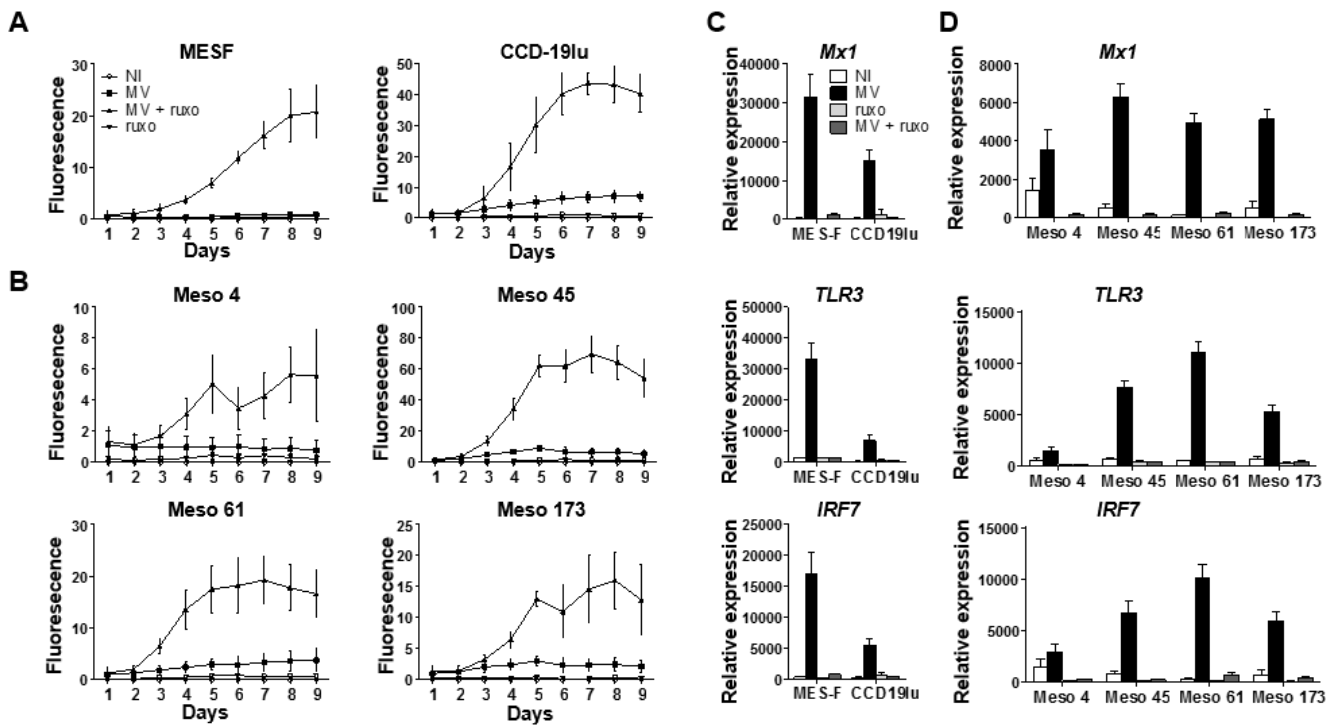
Acknowledgements

We thank Philippe Hulin and the cellular and tissular core facility of Nantes University (MicroPiCell) for their expertise in video microscopy. We thank Juliette Desfrancois and the core facility of flow cytometry (Cytocell). We thank Elise Douillard, Magali Devic, Emilie Maurenton and Nathalie Roi, for excellent technical expertise on genomic analysis. We Thank Sébastien Jacques and the genomic core facility of Institut Cochin (Genom'ic).

Funding details: This work was supported by “La Ligue Régionale Grand Ouest contre le Cancer” (CSIRGO: CD16, CD22, CD44, CD49, CD72, CD79 and CD85), “La Ligue Nationale contre le Cancer”, “L’association ARSMESO44 ”, “La Fondation du Souffle et le Fonds de Dotation Recherche en Santé Respiratoire”, “La fondation ARC”, “La Fondation pour la Recherche Médicale (FRM)”, L’Agence Nationale pour la Recherche (ANR-16-CE18-0016), “bourse Roche de Recherche 2015 en Oncologie Thoracique“, INSERM and “LabEX IGO program supported by the National Research Agency via the investment of the future program ANR-11-LABX-0016-01”. TD was supported by a grant from Ligue contre le Cancer. LQ was supported by grants from Cancéropôle Région Île-de-France.

Disclosure statement: FT, MG and JFF are authors of patents on MV. The other authors do not have conflict of interest.

Figure Legends



*Figure 1: The IFN I response controls MV replication and oncolytic activity. Cells were treated 3 days before infection with ruxolitinib (1 μ M) and infected with MV encoding cherry fluorescent protein (MV-ch) (A and B) or with MV (C-D) at MOI=1. Viral replication of MV-ch was followed by measuring cherry fluorescence at 610 nm during 9 days in healthy cells (A) or in MV-resistant MPM cell lines (B). Relative RNA expression of three ISG, *Mx1*, *TLR3* and *IRF7*, was studied 48h after infection by RT-qPCR in healthy cells (C) or in resistant MPM cell lines (D). *RPLP0* gene expression was used as reference and indicated values are means \pm SEM of relative expression of three independent experiments. NI = non-infected, ruxo = ruxolitinib*

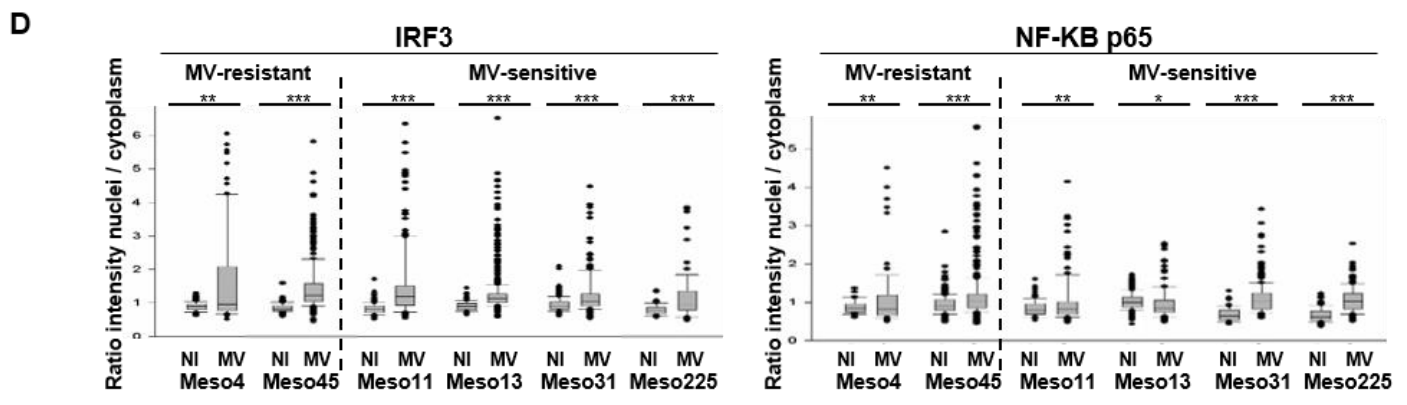
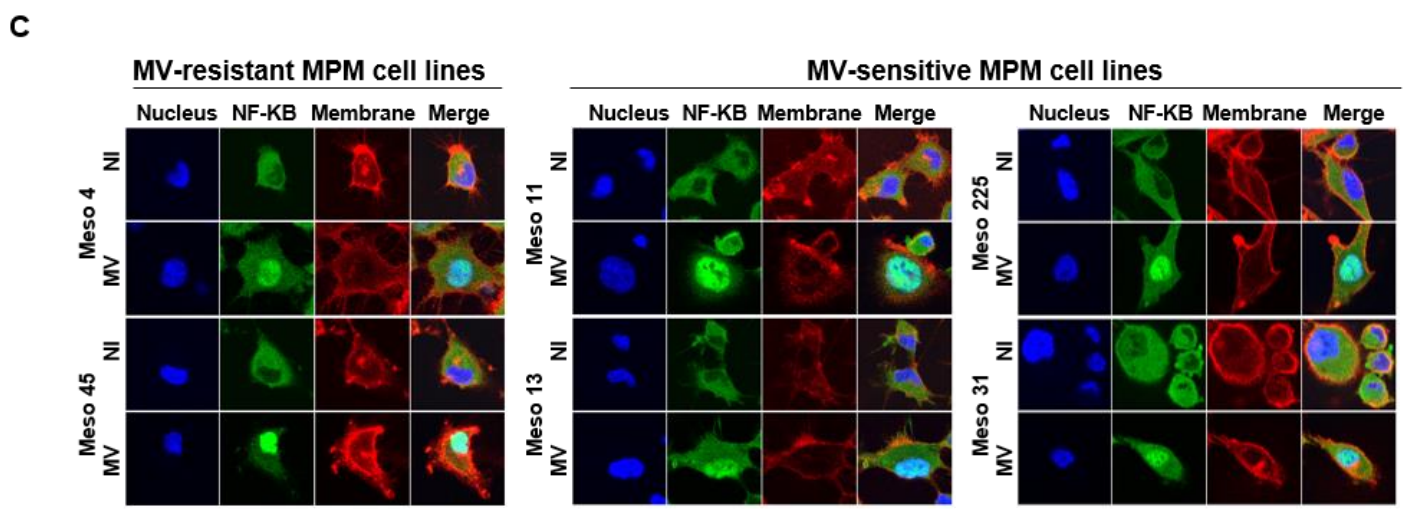
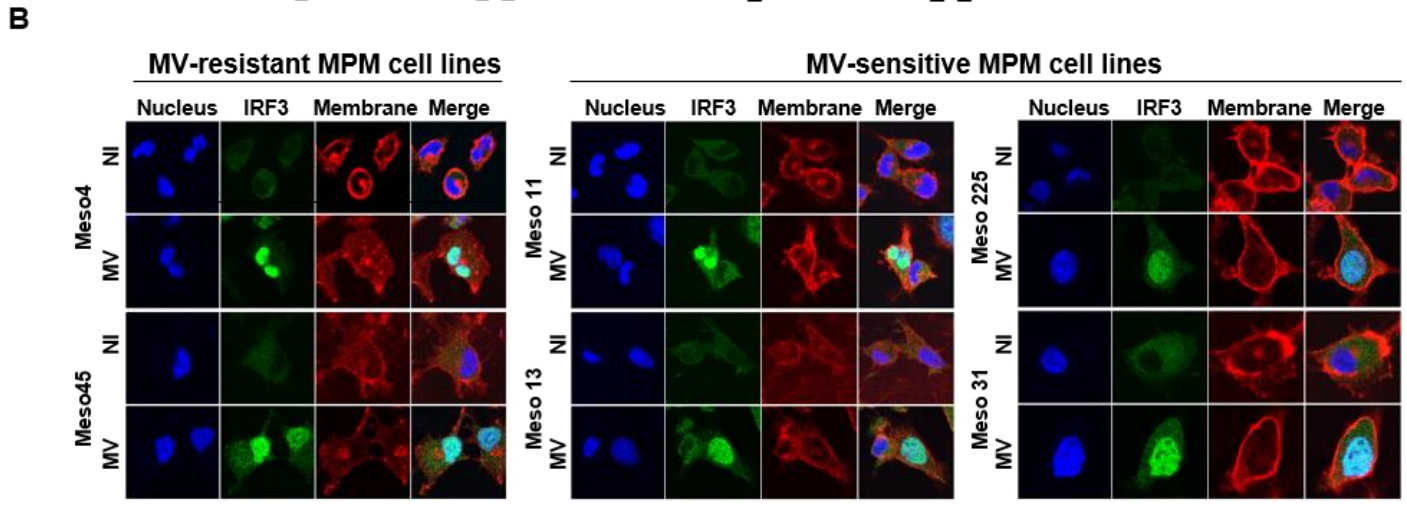
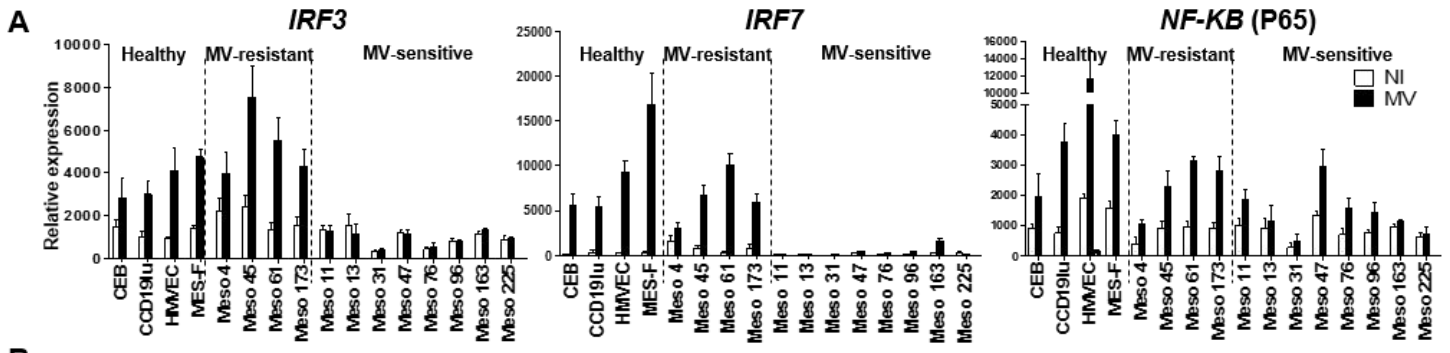
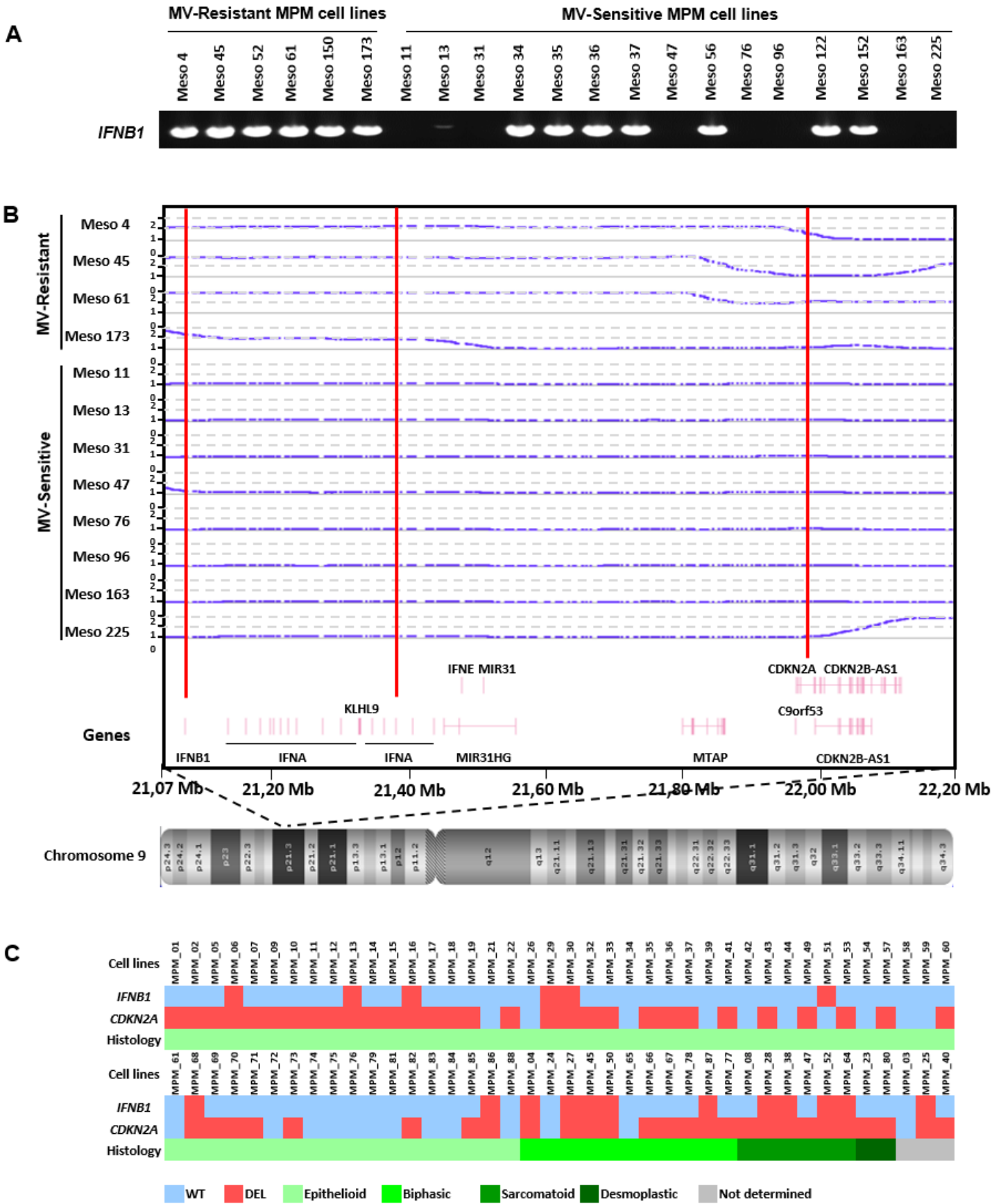


Figure 2: IRF3 and NF-KB signaling is functional in MV-sensitive cells. (A) Cells were infected at MOI=1 during 48h and *IRF3*, *IRF7* and *RELA* (NF-KB p65) genes expression was studied by RT-qPCR with *RPLP0* gene expression used as reference. Indicated values are means \pm SEM of relative expression of three independent experiments. NI = non-infected. (B) Cells were infected at MOI=10 during 12h. Then localization of IRF3 and NF-kBp65 was determined using IRF3 and NF-kBp65 specific monoclonal antibodies and a Dylight 488-conjugated secondary antibodies (green). Membranes were labelled with a lectin marker WGA (red) and nucleus with Hoescht (blue). Fluorescence was analyzed by confocal microscopy. (C) Ratio of the nuclei/cytoplasm fluorescence intensity was measured with the software ImageJ (NIH) on more than 100 cells.



*Figure 3: Frequent bi-allelic deletion of the genes encoding IFN- α and IFN- β in MV-sensitive MPM cell lines. (A) Genomic DNA of MPM cell lines was extracted and presence of the *IFNB1* gene was analyzed by PCR with *IFNB1* primers (chr9:21077267-21078217). (B) Analysis of the copy number of the chromosome 9p21.3 chromosome region containing IFN I and *CDKN2A* genes was performed on extracted DNA from MPM cell lines. Each blue dot represents a genomic probe. Red lines represent location of *IFNB1*, *IFNA2* and *CDKN2A* genes. (C) Analysis of the copy numbers of the *IFNB1* and the *CDKN2A* genes was determined on genomic DNA of 80 short term-cultured MPM cell lines. Genomic DNA was amplified by PCR using *IFNB1* primers (chr9:21077267-21078217) and the deletion status was determined based on the presence of an amplification by capillary electrophoresis. *IFNB1* and *CDKN2A* deletion status, and histologic types are indicated in the heat map (DEL: bi-allelic deletion; WT: wild-type; MME: epithelioid MPM; MMB: biphasic MPM; MMS: sarcomatoid MPM; MMD: desmoplastic MPM; ND: not determined).*

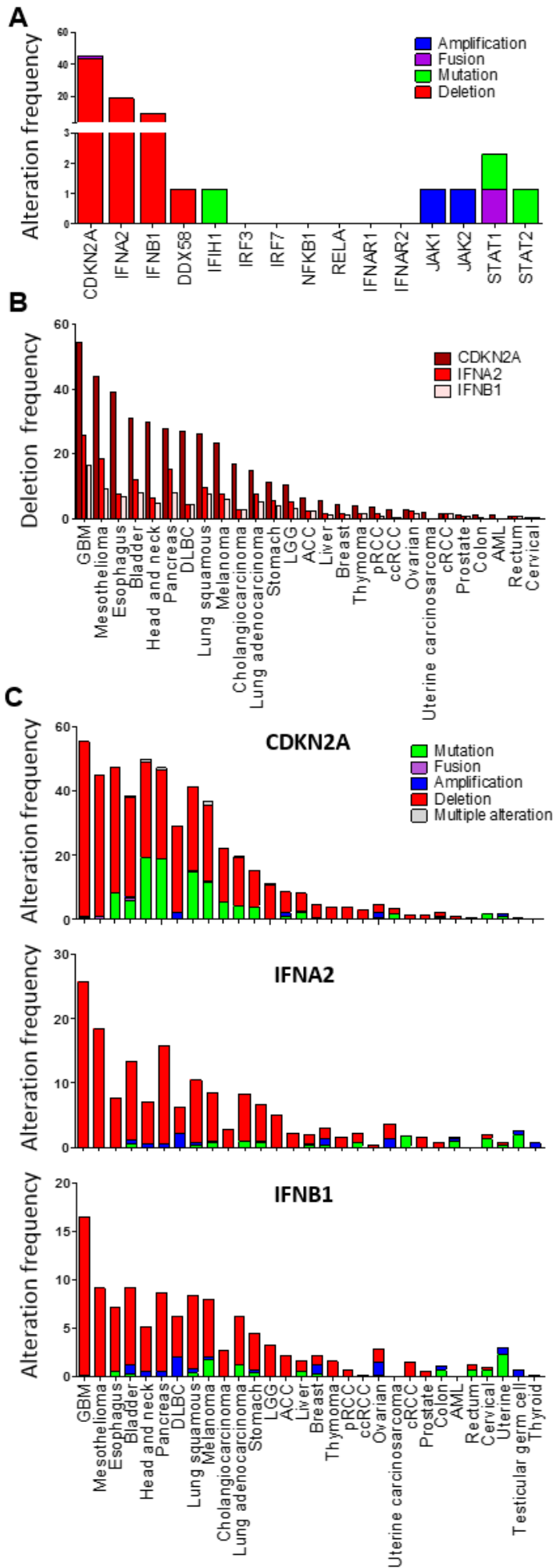


Figure 4: Bi-allelic deletion of IFN I encoding genes are frequent in mesothelioma and other cancers. (A) Frequency of alteration of genes coding for protein implicated in the IFN I response in mesothelioma. (B) Frequency of CDKN2A, IFNA2 and IFNB1 genes bi-allelic deletions in different types of cancer. (C) Frequency of alteration of CDKN2A, IFNA2 and IFNB1 genes in different types of cancer. These results were obtained from TCGA database using cbiportal.org website. GBM=Glioblastoma multiforme, DLBC=diffuse large B-cell lymphoma, LGG=Low grade glioma, ACC=adenoid cystic carcinoma, pRCC=papillary renal cell carcinoma, ccRCC=clear renal cell carcinoma, cRCC= chromophobe renal cell carcinoma, AML=acute myeloid leukemia.

Figure 5: Partial IFN I and proinflammatory response from IFN I^{-/-} MPM cell lines exposed to MV. Cells were infected with MV at MOI=1 or treated with IFN I (IFN- α and IFN- β) during 48h. For each sample, equal amounts of RNA from three separate experiments were mixed. Transcriptome analysis was performed with Affymetrix human Gene 2.0 ST arrays according to the manufacturer's protocol. (A) Differential expression of the IFN genes and their receptors were analyzed comparing the MV infected or IFN I treated cells with untreated cells. (B) Differential expression of the IFN genes and their receptors were analyzed comparing untreated MV-resistant MPM (G2) or untreated IFN I^{-/-} MPM cells (G3) with untreated healthy cells (G1). (C) Differential expression of the interferon stimulated genes (ISG) were analyzed comparing the MV infected or IFN I treated cells with untreated cells. (D) Differential expression of the ISG were analyzed comparing untreated MV-resistant MPM (G2) or untreated IFN I^{-/-} MPM cells (G3) with untreated healthy cells (G1). (E) Pathway study was carried out with Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity® Systems) for each group and binary logarithm of fold change was defined (E).

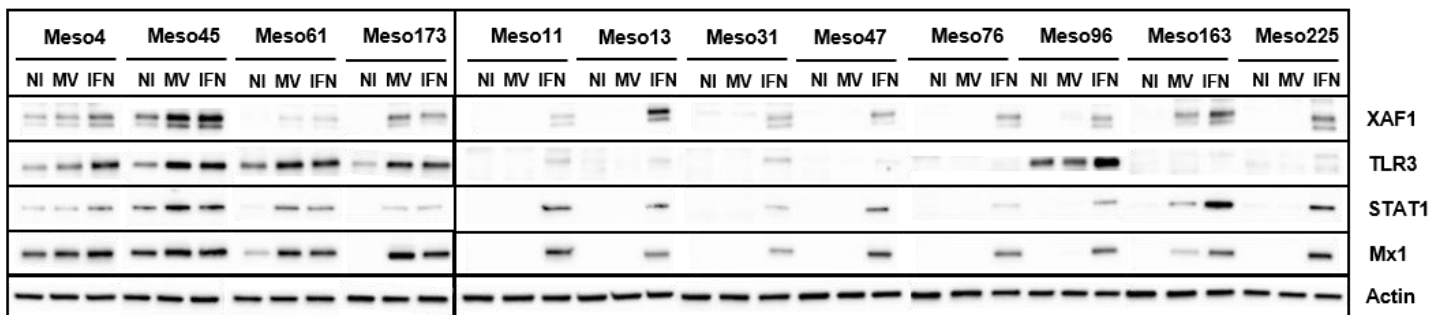
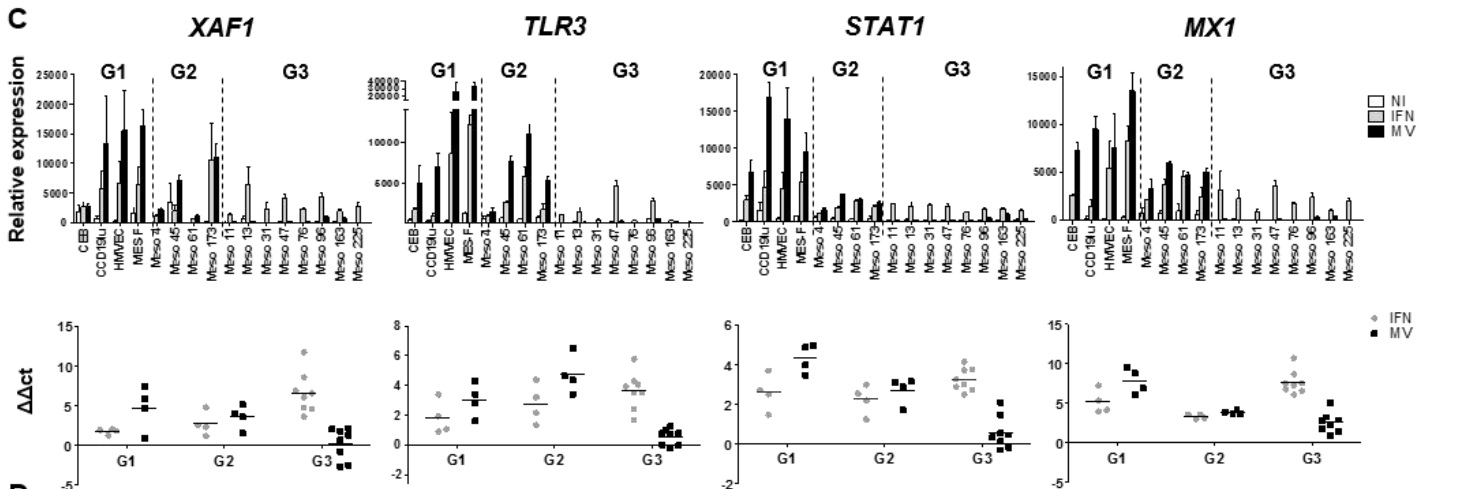
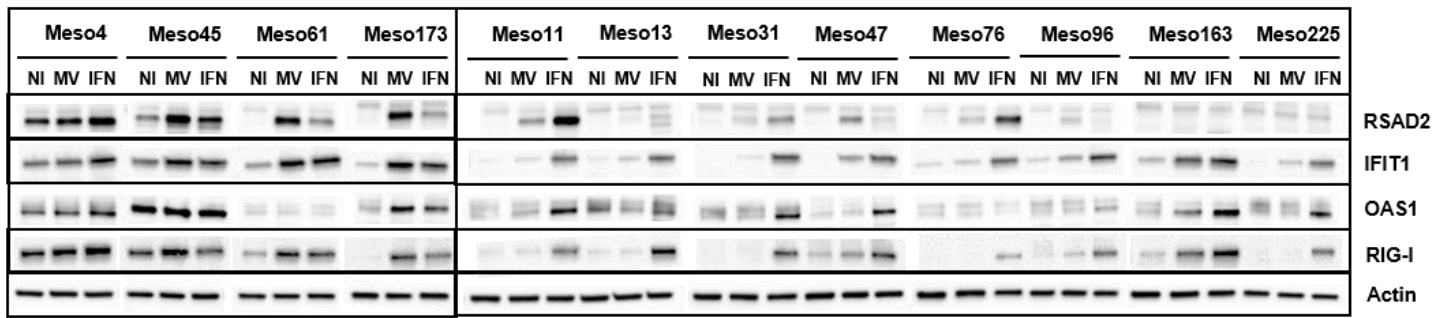
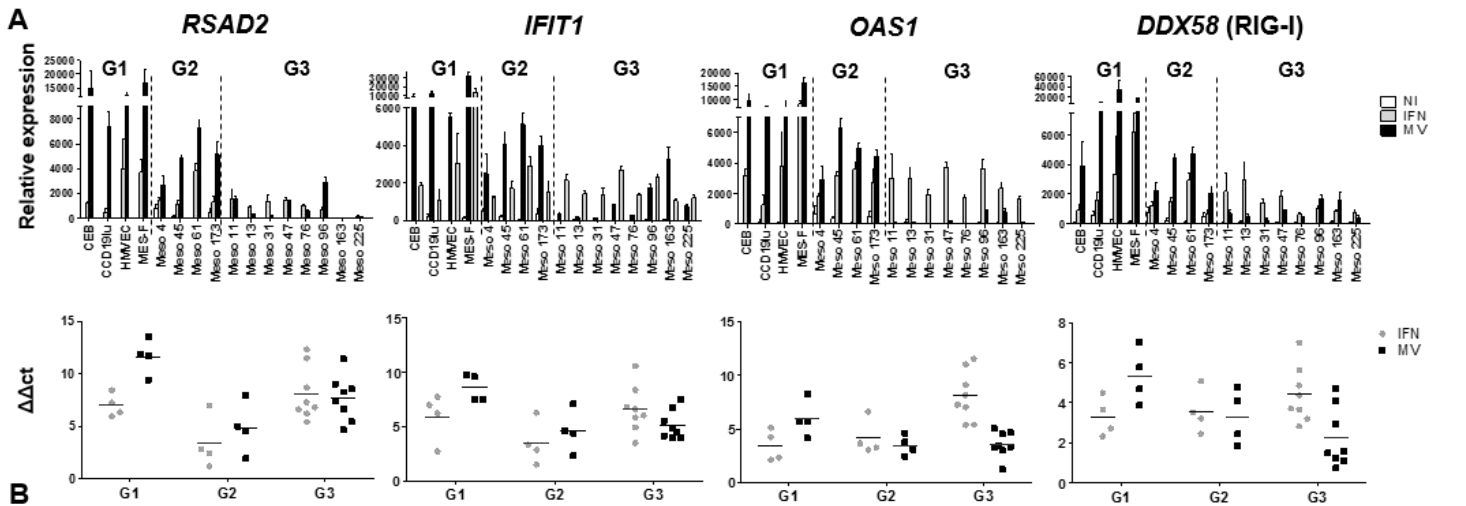


Figure 6. MV exposure induce a partial and weak expression of proteins encoded by ISG in IFN I^{-/-} MPM cell lines. Cells were infected with MV at MOI=1 or treated with IFN I (IFN- α and IFN- β) during 48h. (A) RNA expression of four ISG induced by MV in IFN I^{-/-} MPM cells (RSAD2, IFIT1, OAS1 and DDX58) analyzed by RT-qPCR with RPLPO gene expression used as reference. Results are expressed as means \pm SEM of relative expression of three independent experiments and are also expressed as $\Delta\Delta$ Ct between conditions MV and NI (MV), and conditions IFN I and NI (IFN I). (B) Protein expression of ISG induced by MV in IFN I^{-/-} MPM cells (RSAD2, IFIT1, OAS1 and RIG I) analyzed by western-blot with actin protein expression used as a reference. (C) RNA expression of four ISG that are not induced by MV in IFN I^{-/-} MPM cells (XAF-1, TLR3, STAT1 and Mx1) analyzed by RT-qPCR with RPLPO gene expression used as reference. Results are expressed as means \pm SEM of relative expression of three independent experiments. (D) Protein expression of ISG that are not induced by MV in IFN I^{-/-} MPM cells (XAF-1, TLR3, STAT1 and Mx1) analyzed by western-blot with actin protein expression used as a reference.

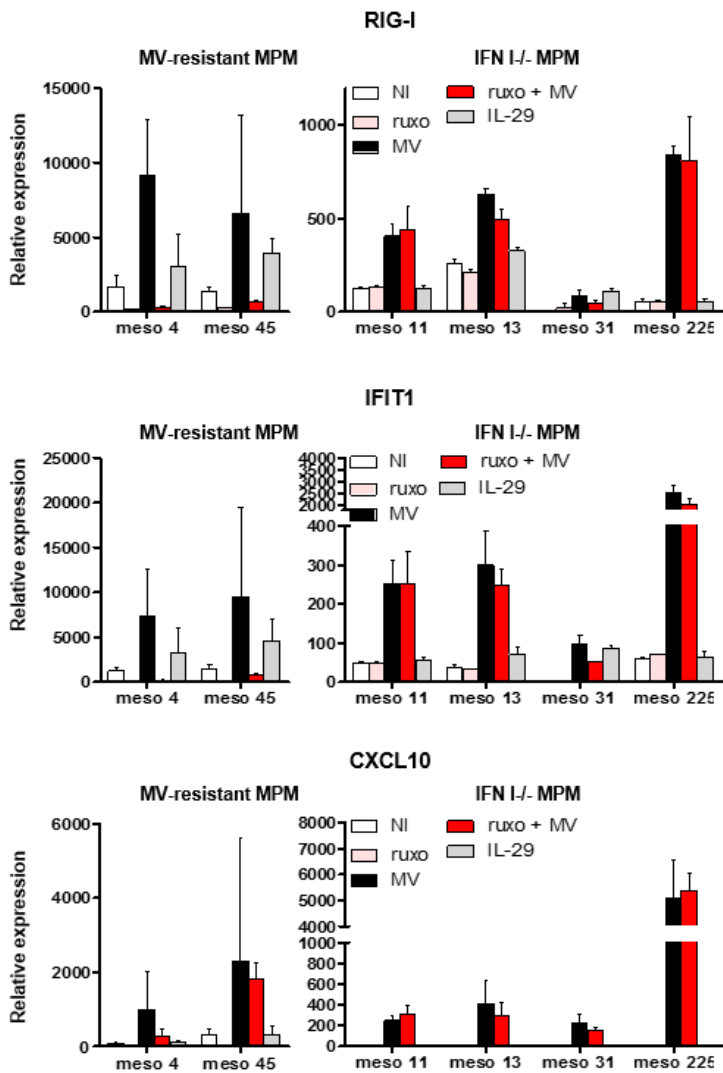
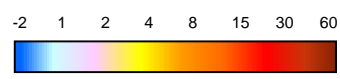
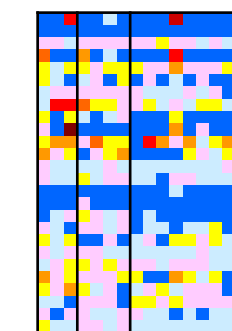
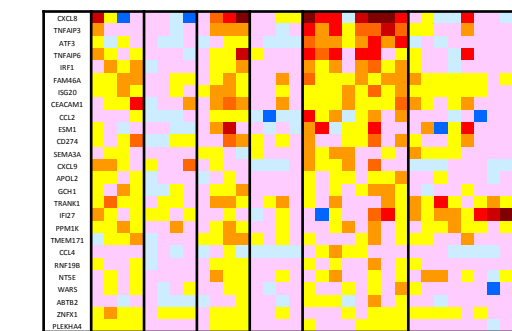
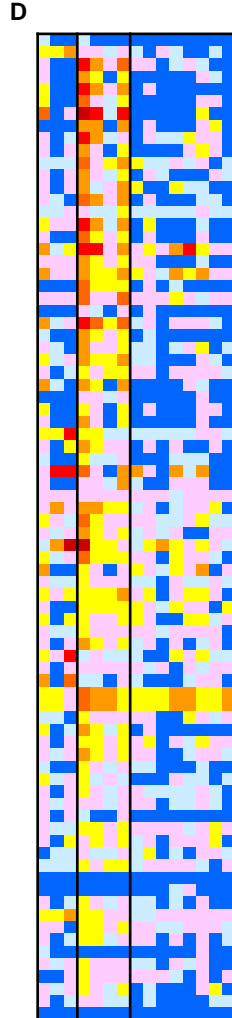
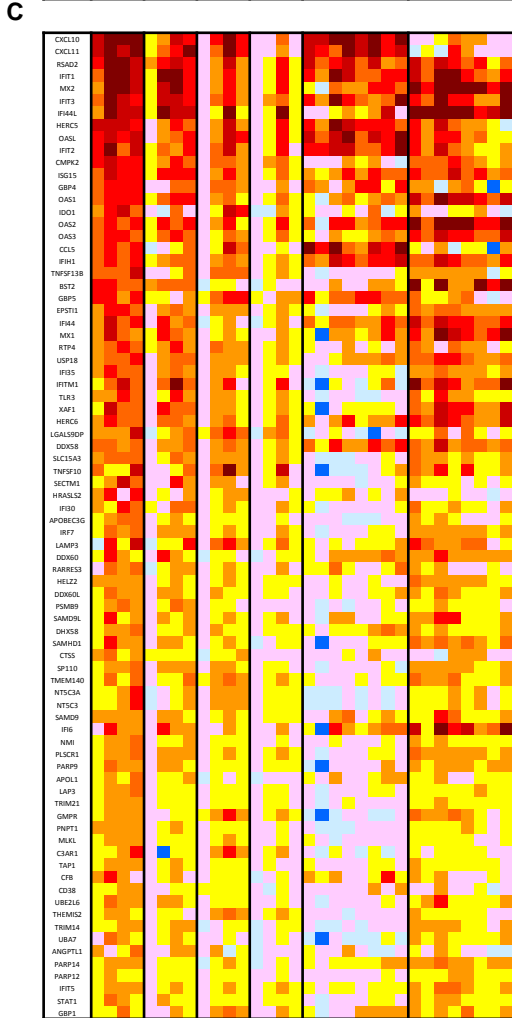
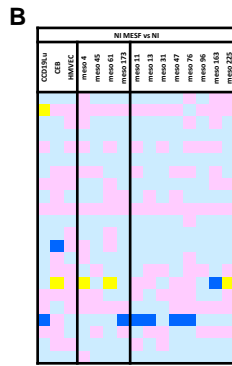
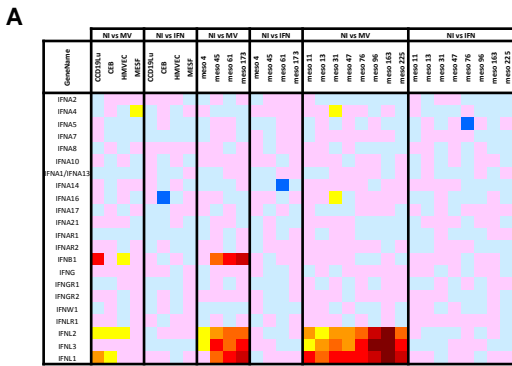


Figure 7. Type III IFN do not induce ISG expression in response to MV in IFN I^{-/-} MPM cell lines. MV-resistant and IFN I^{-/-} MPM cell lines were treated 3 days before infection with ruxolitinib (1μM) and infected with MV or treated with IL-29 (IFN type III). Then, relative RNA expression of three ISGs (*DDX58*, *IFIT1* and *CXCL10*) was studied 48h after treatment by RT-qPCR. RPLPO gene expression was used as reference and results are means ± SEM of relative expression of three independent experiments.



Supplemental data 1. Partial IFN I and proinflammatory response from IFN^{-/-} MPM cell lines exposed to MV. Cells were infected with MV at MOI=1 or treated with IFN I (IFN- α and IFN- β) during 48 hours. For each sample, equal amounts of RNA from three separate experiments were mixed. Transcriptome analysis was performed with Affymetrix human Gene 2.0 ST arrays according to the manufacturer's protocol. (A) Differential expression of the IFN genes and their receptors were analyzed comparing the MV infected or IFN I treated cells with untreated cells. (B) Differential expression of the IFN genes and their receptors were analyzed comparing untreated healthy cells or MPM cell lines with MESF (healthy peritoneal mesothelial cells). (C) Differential expression of the interfeon stimulated genes (ISG) were analyzed comparing the MV infected or IFN I treated cells versus untreated cells. (D) Differential expression of the ISG were analyzed comparing untreated healthy cells or MPM cell lines with MESF (healthy peritoneal mesothelial cells).

References

1. Kaufman HL, Kohlhapp FJ, Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2015 Sep;14(9):642-62 **2015**;14:642-62
2. Russell SJ, Peng KW, Bell JC. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol* **2012**;30:658-70
3. Lichty BD, Breitbach CJ, Stojdl DF, Bell JC. Going viral with cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* **2014**;14:559-67
4. Achard C, Surendran A, Wedge ME, Ungerechts G, Bell J, Ilkow CS. Lighting a Fire in the Tumor Microenvironment Using Oncolytic Immunotherapy. *EBioMedicine* **2018**;31:17-24
5. Guillerme JB, Gregoire M, Tangy F, Fonteneau JF. Antitumor virotherapy by attenuated measles virus (MV). *Biology (Basel)* **2013**;2:587-602
6. Robinson S, Galanis E. Potential and clinical translation of oncolytic measles viruses. *Expert Opin Biol Ther* **2017**;17:353-63
7. Dorig RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* **1993**;75:295-305
8. Nanche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B, Roubourdin-Combe C, *et al.* Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* **1993**;67:6025-32
9. Fishelson Z, Donin N, Zell S, Schultz S, Kirschfink M. Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. *Mol Immunol* **2003**;40:109-23
10. Ravindranath NM, Shuler C. Expression of complement restriction factors (CD46, CD55 & CD59) in head and neck squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* **2006**;35:560-7
11. Anderson BD, Nakamura T, Russell SJ, Peng KW. High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus. *Cancer Res* **2004**;64:4919-26
12. Achard C, Boisgerault N, Delaunay T, Roulois D, Nedellec S, Royer PJ, *et al.* Sensitivity of pleural mesothelioma to oncolytic measles virus depends on defects of the type I interferon response. *Oncotarget* **2015**;Nov 2
13. Berchtold S, Lampe J, Weiland T, Smirnow I, Schleicher S, Handgretinger R, *et al.* Innate immune defense defines susceptibility of sarcoma cells to measles vaccine virus-based oncolysis. *J Virol* **2013**;87:3484-501
14. Noll M, Berchtold S, Lampe J, Malek NP, Bitzer M, Lauer UM. Primary resistance phenomena to oncolytic measles vaccine viruses. *Int J Oncol* **2013**;43:103-12
15. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol* **2014**;32:513-45
16. Grandvaux N, Servant MJ, tenOever B, Sen GC, Balachandran S, Barber GN, *et al.* Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes. *J Virol* **2002**;76:5532-9
17. Nakaya T, Sato M, Hata N, Asagiri M, Suemori H, Noguchi S, *et al.* Gene induction pathways mediated by distinct IRFs during viral infection. *Biochem Biophys Res Commun* **2001**;283:1150-6
18. Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P, *et al.* A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* **2011**;472:481-5
19. Gueugnon F, Leclercq S, Blanquart C, Sagan C, Cellerin L, Padiou M, *et al.* Identification of novel markers for the diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Am J Pathol* **2011**;178:1033-42
20. Hackett TL, Warner SM, Stefanowicz D, Shaheen F, Pechkovsky DV, Murray LA, *et al.* Induction of epithelial-mesenchymal transition in primary airway epithelial cells from patients with asthma by transforming growth factor-beta1. *Am J Respir Crit Care Med* **2009**;180:122-33

21. de Reynies A, Jaurand MC, Renier A, Couchy G, Hysi I, Elarouci N, *et al.* Molecular classification of malignant pleural mesothelioma: identification of a poor prognosis subgroup linked to the epithelial-to-mesenchymal transition. *Clin Cancer Res* **2014**;20:1323-34
22. Tranchant R, Quétel L, Tallet A, Meiller C, Renier A, de Koning L, *et al.* Co-occurring Mutations of Tumor Suppressor Genes, LATS2 and NF2, in Malignant Pleural Mesothelioma. *Clin Cancer Res* **2017**;23:3191-202
23. Combredet C, Labrousse V, Mollet L, Lorin C, Delebecque F, Hurtrel B, *et al.* A molecularly cloned Schwarz strain of measles virus vaccine induces strong immune responses in macaques and transgenic mice. *J Virol* **2003**;77:11546-54
24. Yap TA, Aerts JG, Popat S, Fennell DA. Novel insights into mesothelioma biology and implications for therapy. *Nat Rev Cancer* **2017**;17:475-88
25. Jean D, Daubriac J, Le Pimpec-Barthes F, Galateau-Salle F, Jaurand MC. Molecular changes in mesothelioma with an impact on prognosis and treatment. *Arch Pathol Lab Med* **2012**;136(3):277-93
26. Cheng JQ, Jhanwar SC, Klein WM, Bell DW, Lee WC, Altomare DA, *et al.* p16 alterations and deletion mapping of 9p21-p22 in malignant mesothelioma. *Cancer Res* **1994**;54:5547-51
27. Xio S, Li D, Vijg J, Sugarbaker DJ, Corson JM, Fletcher JA. Codeletion of p15 and p16 in primary malignant mesothelioma. *Oncogene* **1995**;11:511-5
28. Monaco SE, Shuai Y, Bansal M, Krasinskas AM, Dacic S. The diagnostic utility of p16 FISH and GLUT-1 immunohistochemical analysis in mesothelial proliferations. *Am J Clin Pathol* **2011**;135:619-27
29. Chiosea S, Krasinskas A, Cagle PT, Mitchell KA, Zander DS, Dacic S. Diagnostic importance of 9p21 homozygous deletion in malignant mesotheliomas. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **2008**;21:742-7
30. Dacic S, Kothmaier H, Land S, Shuai Y, Halbwedl I, Morbini P, *et al.* Prognostic significance of p16/cdkn2a loss in pleural malignant mesotheliomas. *Virchows Arch* **2008**;453:627-35
31. Illei PB, Rusch VW, Zakowski MF, Ladanyi M. Homozygous deletion of CDKN2A and codeletion of the methylthioadenosine phosphorylase gene in the majority of pleural mesotheliomas. *Clin Cancer Res* **2003**;9:2108-13
32. Yoshikawa Y, Emi M, Hashimoto-Tamaoki T, Ohmuraya M, Sato A, Tsujimura T, *et al.* High-density array-CGH with targeted NGS unmask multiple noncontiguous minute deletions on chromosome 3p21 in mesothelioma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2016**;Nov 22;113(47):13432-7
33. Kaufmann JK, Chiocca EA. Glioma virus therapies between bench and bedside. *Neuro Oncol* **2014**;16:334-51
34. Marchini A, Bonifati S, Scott EM, Angelova AL, Rommelaere J. Oncolytic parvoviruses: from basic virology to clinical applications. *Virology journal* **2015**;12:6
35. Allagui F, Achard C, Panterne C, Combredet C, Labarriere N, Dreno B, *et al.* Modulation of the Type I Interferon Response Defines the Sensitivity of Human Melanoma Cells to Oncolytic Measles Virus. *Curr Gene Ther* **2017**
36. Boisgerault N, Guillerme JB, Pouliquen D, Mesel-Lemoine M, Achard C, Combredet C, *et al.* Natural oncolytic activity of live-attenuated measles virus against human lung and colorectal adenocarcinomas. *Biomed Int Res* **2013**;2013:387362
37. Kurokawa C, Iankov ID, Anderson SK, Aderca I, Leontovich AA, Maurer MJ, *et al.* Constitutive Interferon Pathway Activation in Tumors as an Efficacy Determinant Following Oncolytic Virotherapy. *Journal of the National Cancer Institute* **2018**
38. Ye Z, Dong H, Li Y, Ma T, Huang H, Leong HS, *et al.* Prevalent Homozygous Deletions of Type I Interferon and Defensin Genes in Human Cancers Associate with Immunotherapy Resistance. *Clin Cancer Res* **2018**

39. Pinto AK, Ramos HJ, Wu X, Aggarwal S, Shrestha B, Gorman M, *et al.* Deficient IFN signaling by myeloid cells leads to MAVS-dependent virus-induced sepsis. *PLoS Pathog* **2014**;10:e1004086
40. Delaunay T, Violland M, Boisgerault N, Dréno B, Labarrière N, Bell JC, *et al.* Oncolytic viruses sensitize tumor cells for NYESO-1 tumor antigen recognition by CD4+ effector T cells. in revision **2017**;Dec 26;7(3):e1407897
41. Achard C, Boisgerault N, Delaunay T, Tangy F, Grégoire M, Fonteneau JF. Induction of immunogenic tumor cell death by attenuated oncolytic measles virus. *J Clin Cell Immunol* **2015**;in press
42. Achard C, Guillerme JB, Bruni D, Boisgerault N, Combredet C, Tangy F, *et al.* Oncolytic measles virus induces Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated cytotoxicity by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Oncoimmunology* **2016**;6:e1261240
43. Donnelly OG, Errington-Mais F, Steele L, Hadac E, Jennings V, Scott K, *et al.* Measles virus causes immunogenic cell death in human melanoma. *Gene Ther* **2011**
44. Fonteneau JF, Gilliet M, Larsson M, Dasilva I, Munz C, Liu YJ, *et al.* Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* **2003**;101:3520-6
45. Gauvrit A, Brandler S, Sapede-Peroz C, Boisgerault N, Tangy F, Gregoire M. Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response. *Cancer Res* **2008**;68:4882-92
46. Guillerme JB, Boisgerault N, Roulois D, Menager J, Combredet C, Tangy F, *et al.* Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Clin Cancer Res* **2013**;19:1147-58
47. Galanis E, Atherton PJ, Maurer MJ, Knutson KL, Dowdy SC, Cliby WA, *et al.* Oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter to treat drug-resistant ovarian cancer. *Cancer Res* **2015**;75:22-30

Article n°2: High oncolytic activity of a double deleted Vaccinia Virus Copenhagen strain against pleural mesothelioma

Tiphaine Delaunay*, Joelle Nader*, Isabelle Farine, Johann Foloppe, Thibaut Blondy, Mathilde Violland, Daniel Pouliquen, Nicolas Boisgerault, Marc Grégoire, Philippe Erbs and Jean-François Fonteneau.

Introduction :

Le mésothéliome pleural malin (MPM) est un cancer agressif de la plèvre résistant aux traitements conventionnels. Il est donc urgent de développer de nouvelles approches thérapeutiques contre cette malignité. L'immunothérapie oncolytique, basée sur l'utilisation de virus qui se répliquent exclusivement dans les cellules tumorales, est une stratégie en plein essor.

La souche Copenhagen du virus de la vaccine (VV) présente une délétion des gènes codant pour la thymidine kinase (TK) et la ribonucléotide réductase (RR) assurant la spécificité tumorale. De plus, cette souche exprime la protéine fluorescente verte (GFP) pour permettre le suivi de la réplication virale. Le VV a déjà montré son efficacité en clinique dans le traitement de plusieurs cancers. Dans le but de développer un essai clinique pour le traitement du MPM, nous avons réalisé une collaboration avec la société Française Transgene (Strasbourg) afin d'évaluer l'activité oncolytique *in vitro* et *in vivo* de la souche Copenhagen sur des lignées de MPM.

Méthodes :

Dans un premier temps, nous avons étudié *in vitro* la sensibilité de 22 lignées humaines de MPM disponibles au laboratoire à l'activité oncolytique du VVTK-/RR- afin d'estimer le pourcentage de patients potentiellement sensibles à ce virus. Nous avons suivi la réplication virale du VVTK-/RR- par vidéomicroscopie et en mesurant la fluorescence GFP dans les lignées de MPM. De plus, un titrage du VVTK-/RR- 48h après infection nous a permis de mesurer plus finement la réplication virale. Nous avons aussi évalué l'induction de la mort cellulaire chez les lignées de MPM après 48h d'infection par ce virus. Dans un deuxième temps, nous avons

analysé l'efficacité thérapeutique *in vivo* du VVTK-/RR- chez des souris NOD SCID porteuses d'une lignée tumorale de MPM humaines injectée en intrapéritonéal (IP).

Résultats :

Nos résultats *in vitro* ont démontré que le VVTK-/RR- infecte et tue efficacement les 22 lignées cellulaires MPM humaines. La quantification de l'amplification virale chez 8 lignées de MPM a permis de déterminer une réplication productive chez toutes les cellules avec des différences entre lignées allant jusqu'à 10 fois. L'injection du VVTK-/RR- en IP chez des souris immunodéficientes porteuses de tumeurs de MPM humaines a induit une régression de la charge tumorale et a significativement augmenté la survie des souris de trois semaines. De plus, le traitement a considérablement réduit le nombre de métastases.

Conclusion :

Ainsi, cette étude démontre que 100% des lignées de MPM sont sensibles à l'activité oncolytique du VVTK-/RR- *in vitro* et qu'il présente un effet bénéfique *in vivo* chez des souris immunodéficientes. L'immunothérapie oncolytique utilisant le virus de la vaccine semble être une stratégie prometteuse pour le traitement des patients atteints de MPM.

High oncolytic activity of a double deleted Vaccinia Virus Copenhagen strain against pleural mesothelioma

Tiphaine Delaunay*^{1,2}, Joelle S. Nader*^{1,2}, Isabelle Farine³, Johann Foloppe³, Thibaut Blondy^{1,2}, Mathilde Violland^{1,2}, Daniel Pouliquen^{1,2}, Nicolas Boisgerault^{1,2}, Marc Grégoire^{1,2}, Philippe Erbs³ and Jean-François Fonteneau^{1,2}.

¹ CRCINA, INSERM, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France

² Labex IGO, Immunology Graft Oncology, Nantes, France

³Transgene, Illkirch, France.

Corresponding author : Jean-François FONTENEAU, INSERM UMR1232, Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes, 8 quai Moncousu, BP 70721, 44007 Nantes cedex 1

Key words: Oncolytic immunotherapy, vaccinia virus, Pleural mesothelioma, thymidine kinase, ribonucleotide reductase

* T.D and J.N. equally contributed to this work.

Abstract

Malignant pleural mesothelioma (MPM) is a cancer of the pleura that lacks efficient treatment. Oncolytic immunotherapy using oncolytic vaccinia virus (VV) may represent an alternative therapeutic approach for the treatment of this malignancy. Here we studied the oncolytic activity against MPM of VVTK-RR-/GFP that is a VV from the Copenhagen strain that is deleted of two genes encoding the thymidine kinase (*J2R*) and the ribonucleotide reductase (*I4L*) and that express the green fluorescent protein (GFP). First we show *in vitro* that VVTK-RR-/GFP efficiently infects and kills twenty two human MPM cell lines. We also show that the virus replicates in all eight tested MPM cell lines, however with approximately a 10 fold-differences in the amplification level from one cell line to another. Then we studied the therapeutic efficiency of VVTK-RR-/GFP in NOD Scid mice that bear peritoneal human MPM tumors. One intraperitoneal infection of VVTK-RR-/GFP reduces the tumor burden and significantly increases mice survival compared to untreated animals. Thus VVTK-RR- may be a promising OV for the oncolytic immunotherapy of MPM.

Introduction

Malignant pleural mesothelioma (MPM) is an aggressive tumor of the pleura, usually associated with chronic asbestos exposure, mainly during occupational activities. Incidence is increasing and is expected to peak around the year 2020 in western world, and to continue to rise in developing countries (1). Clinical strategies actually developed in MPM treatments including chemotherapy, radiotherapy and surgery, are of limited efficacy. There is an urgent need of new therapeutic approaches.

Oncolytic virotherapy is a therapeutic approaches that is developing rapidly and meets its first success (2). It consists in using oncolytic viruses (OV) that exclusively or preferentially infect and replicate in tumor cells inducing their immunogenic cell death. Several oncolytic vaccinia viruses (VV) are now evaluated in clinical trials for the treatment of different types of cancer (3). Among them, TG6002 is a VV from the Copenhagen strain that is deleted of two genes that encode thymidine kinase (TK) and ribonucleotide reductase (RR) and expresses the suicide gene FCU1 (4). TG6002 replicates preferentially in tumor cells due to their high TK and RR activities. This OV is entering phase I clinical trial for the treatment of recurrent glioblastoma (clinicaltrials.gov: NCT03294486).

In this work, we studied a variant of TG6002 that does not contain the FCU1 gene, but instead the gene encoding Green Fluorescent Protein: VVTK-RR-/GFP. We measured *in vitro* the oncolytic activity of this OV against a large panel of 22 MPM human MPM tumor cell lines. We show that they are all lysed by VVTK-RR-/GFP, despite differences in the level of viral replication. We also show that VVTK-RR-/GFP is able to reduce *in vivo* the tumor burden and to increase significantly the survival of NOD Scid Mice bearing peritoneal human MPM tumors. Overall our work shows that TG6002 may be an interesting OV for the treatment of MPM.

Material and methods

Cell Culture

The 22 human MPM cell lines (from Meso4 to Meso225) were established in our laboratory from pleural effusions collected by thoracocentesis, and genetically characterized (5). All patients gave their informed consent. All cell lines were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100U/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin and 2mM L-glutamine (all reagents from Gibco-Invitrogen) and cultured at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Cells were routinely checked for Mycoplasma contamination using the Plasmotest™ from InvivoGen.

Vaccinia Virus VVTK-RR-/GFP

Attenuated recombinant vaccinia virus VVTK-RR-/GFP was derived from the Copenhagen strain and was deleted in the thymidine kinase (TK) and ribonucleotide reductase (RR) genes and expressed the green fluorescent protein (GFP). GFP is under the control of the p11k7.5 early-late promoter (6). VVTK-RR-/GFP was propagated and titrated in chicken embryo fibroblasts as previously described (7).

Video microscopy

One day before infection, MPM cells were seeded in 24-well plates, at a density of 10⁵ cells/well. Cells were then infected with VVTK-RR-/GFP (MOI=0.1). The time-lapse video microscopy was made using a Leica DMI6000B microscope with a 10x objective. Images were acquired every 15min for 4 days. We used MetaMorph® Microscopy Automation & Image Analysis Software (version 7.8) and Fiji Software for acquisition and analysis (8).

Measurement of MPM cell line infection by VVTK-RR-/GFP

MPM cell lines were seeded in 12-well plates at a density of 0.2×10^6 cells/well in 2ml of culture medium containing VVTK-RR-/GFP at MOI of 0.01 or 0.1. After 24h of culture, cells were harvested for measurement of infection. For measurement of infection, cells were fixed with phosphate saline buffer (PBS) containing 1% paraformaldehyde during 10min at room temperature and washed with PBS. GFP fluorescence was analyzed by flow cytometry on a FACS Calibur (BD Biosciences) and analyzed using the BD CellQuest™ Pro software.

Measurement of MPM cell death

To measure MPM cell death induced by VVTK-RR-/GFP, MPM cell lines were cultured and exposed to VVTK-RR-/GFP as for the measurement of infection above. After 48h, some supernatants were collected for measurement of VVTK-RR-/GFP replication below and cells were harvested and labeled with an annexin V-APC/propidium iodide (PI) labeling kit (BD Pharmingen) according to manufacturer instructions. Cells were then fixed with PBS 1% paraformaldehyde. Annexin V-APC fluorescence was analyzed by flow cytometry as above.

Measurement of VVTK-RR-/GFP replication in MPM cell lines

Plaque-forming unit (PFU) assay was performed on supernatants collected from the 48h cultures of MPM cell lines with VVTK-RR-/GFP as described (7). The VVTK-RR-/GFP amplification factor was determined by dividing the PFU found in the supernatants by the PFU that were added at the start of the culture

VVTK-RR-/GFP treatment of NOD scid Mice bearing Human MPM Meso163 cell line xenograft

All *in vivo* experiments complied with European Union regulations on the welfare and use of animals in cancer research. Six week-old female NOD Scid mice were purchased from Centre d'Élevage Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). Twenty mice were challenged intraperitoneally with 5×10^6 tumor cells. After 3 weeks, 100 μ L of PBS were injected in the intraperitoneal cavity of half of the mice. The others received 100 μ L of PBS containing 1.10^7 PFU of VVTK-RR-/GFP intraperitoneally. Mice were followed at least every two days and sacrificed when they became moribund (weight loss, decreased mobility). Mice were then dissected. Tumors were collected and stored three weeks in PBS containing 4% paraformaldehyde at 4°C and then in PBS at 4°C.

Results and discussion

MPM cell lines are highly sensitive to the oncolytic activity of VVTK-RR-/GFP in vitro.

First we assessed *in vitro* the oncolytic activity of the VVTK-RR-/GFP against 22 human MPM cell lines. The GFP gene is under the control of a promoter active during the early and late phase of the viral replication and allow to follow the infection during 4 days by fluorescent video microscopy (Figure 1A and supplemental video 1 to 8). We also measured the fluorescence by flow cytometry 24h after the infection (Figure 1B and 1C).

We found that all MPM cell lines were sensitive to the infection by VVTK-RR-/GFP. The first wave of green fluorescent tumor cells usually appears between 12h to 15h after the start of the infection. After 24h, the infection spreads to other cells with the apparition of a second wave of green fluorescent tumor cells. Between 24h and 48 h after the infection, mobility of tumor cells decreases. This slowing down is quite impressive with Meso11, Meso13 and Meso163 MPM cell lines (supplemental video 2, 3 and 6). After 48h tumor cells detached from the plastic support and get a round shape probably due to apoptosis induction. Tumor cells then start to burst. Ruptures of the cell membrane provoke rapid loss of the green fluorescence. This secondary necrosis is more or less rapid with cell lines like Meso13 that have lost all the fluorescence by 96h and cell lines that take more time to burst such as Meso34 (supplemental videos 3 and 4). After 4 days, all the 22 MPM cell lines infected by VVTK-RR-/GFP exhibit morbidity that lead to cell death in a few more days.

During the infection, the level of maximum fluorescence varied from one cell lines to another. For instance Meso225 and Meso173 failed to reach high level of fluorescence, whereas Meso13 and Meso34 reach high level of fluorescence (Figure

1B and supplemental videos 3, 4, 7 and 8). These experiments show that human MPM is highly sensitive to VVTK-RR-/GFP infection.

Then we studied the induction of cell death by VVTK-RR-/GFP on the 22 MPM cell lines by annexin V-APC/ IP staining 48h after infection. The GFP fluorescence from the infected cells was so strong that it interferes with the IP staining and could not be compensated. However we observed a significant annexin V staining on the 22 MPM cell lines in the presence of VVTK-RR-/GFP (figure 2). It confirms the observations made by video microscopy (supplemental videos 1-8) that all human MPM cell lines are sensitive to the oncolytic activity of VVTK-RR-/GFP.

Then, we measured replication of VVTK-RR-/GFP in 8 MPM cell lines by PFU assay on 48h-culture supernatants. We were able to detect infectious particle in all supernatants (Figure 3A), especially at the lowest MOI (0.01). Replication was low in three MPM cell lines (Meso11, 163 and 225), medium in three others (Meso13, 45 and 173) and high in the last two (Meso4 and 34). Replication was higher at the lowest MOI (0.01) since it allows more wave of infections than the highest MOI (0.1) (Figure 3B).

Altogether these results show that all human MPM cell lines are highly sensitive to the oncolytic activity of VVTK-RR-/GFP. *In vitro*, the virus is able to replicate and induces cell death that ends up into secondary necrosis. Only one study addressed the *in vitro* sensitivity of six human MPM cell lines to oncolytic VV and reported that all were sensitive (9). Herein, we show that 22 out of 22 human MPM cell lines are sensitive. This result suggests that antiviral type I interferon (IFN I) response seems to fail to protect tumor cells from VVTK-RR-/GFP replication. Indeed, we recently showed on the same 22 human MPM cell lines that 15 exhibit defects in the IFN I response that makes them sensitive to oncolytic MV virus (10). Seven MPM cell lines were able to control MV replication by a functional IFN I response. Among these 7 MPM cell lines,

we showed that Meso4, 45 and 173 are not able to control VVTK-RR-/GFP replication. Thus, either VVTK-RR-/GFP replication is not sensitive to the type I IFN response due to virulence factor such as B18R that are able to block the type I IFN response (11), or there is a failure to detect the VVTK-RR-/GFP in these cell lines.

In vivo oncolytic activity of VVTK-RR-/GFP.

To confirm our *in vitro* observations regarding oncolytic activity of VVTK-RR-/GFP, we studied the ability of the virus to cure NOD Scid mice that bear intraperitoneal human Meso163 tumor (Figure 4). In a first experiment on a small number of NOD Scid mice (n=3), we determined that the injection of 1.10^7 PFU was not toxic, whereas 1.10^8 PFU was lethal (data not shown). In a second experiment, we observed that the intraperitoneal injection of VVTK-RR-/GFP to NOD Scid mice that bear Meso163 tumor cells significantly increased the mean survival (MS) compared to mice that received PBS (MS PBS=33days; MS VVTK-RR-/GFP=55days; p value=0,0001 (Mantel-cox)) (Figure 4A).

Mice were dissected to evaluate the tumor burden (Figure 4B). Mice that received PBS exhibit numerous metastasis on the abdominal muscular layer, the omentum, the mesentery, the stomach, the peritoneum and the diaphragm. In VVTK-RR-/GFP treated animals, we observed not more than three massive tumors that often develop in the omentum and/or near the sternum in all animals. This results suggest that VVTK-RR-/GFP succeed to eradicate a lot of metastasis, but failed to control a very small number of tumors that may be the primary tumors. The failure of VVTK-RR-/GFP to totally cure these mice may be due to the absence of an adaptive immune system that should enhance the oncolytic efficacy by the induction of an antitumor immune response. Indeed, it has been shown that oncolytic VV induce an

immunogenic cell death that allows antigen presenting cells to prime naïve T cell to develop an antitumor immune response (4, 12). We also reported recently that VVTK-RR-/GFP can increase effector cytotoxic CD4+ T cell activation by increasing the HLA class II tumor antigen presentation by tumor cells (Delaunay T, Oncoimmunology, 2017). One way to increase efficacy of this double deleted VV is to arm this virus with a suicide gene encoding an enzyme that transforms a prodrug into a drug such as the gene FCU1 (7).

Conclusion

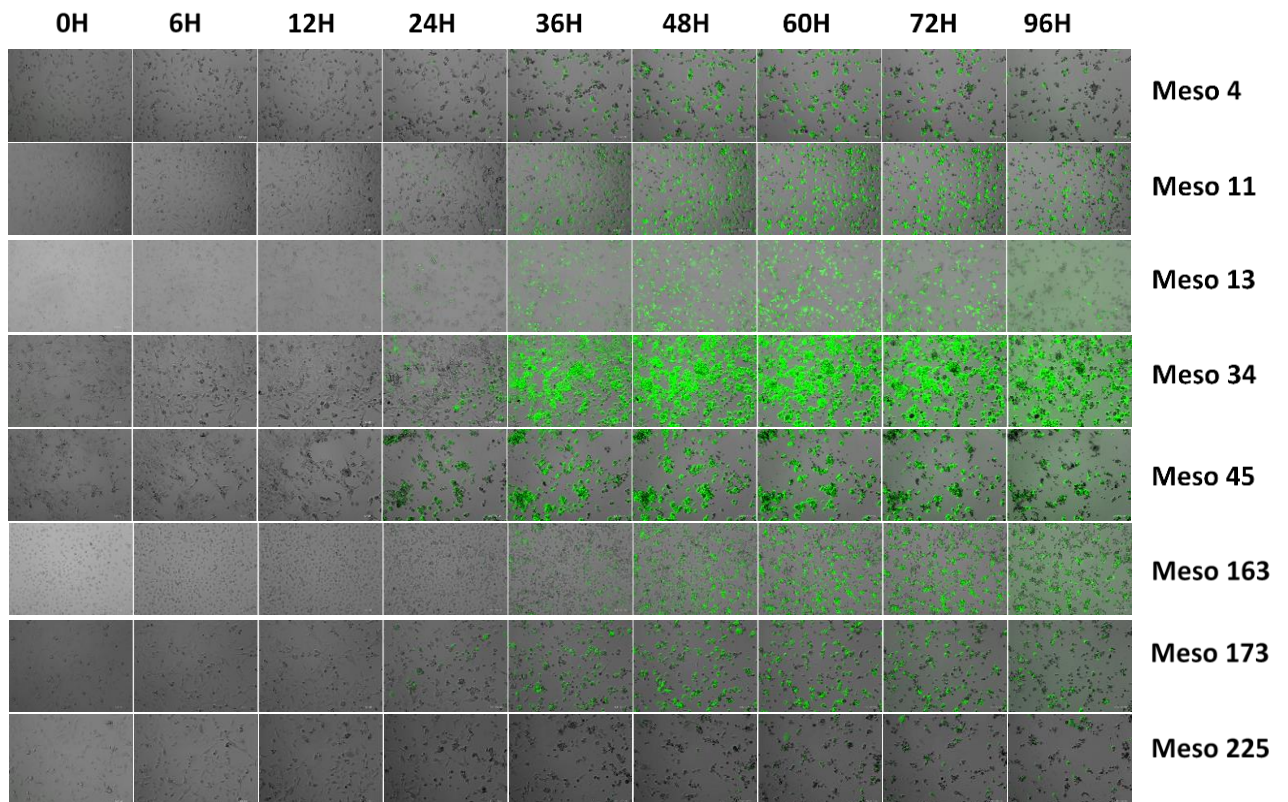
Altogether, our results show that human MPM is highly sensitive to oncolytic VVTK-RR-/GFP. It could be consider to inject oncolytic VV in the pleural cavity or intra-tumorally to treat MPM patients. Indeed, oncolytic VV are evaluated in clinical trials for the treatment of several types of cancer, notably Pexa-Vec that is a Wyeth strain VVtk- that encodes GM-CSF. Pexa-Vec is now evaluated in phase III in combination with Sorafenib, a tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma (Clinicaltrials.gov NCT02562755), after the reports of promising clinical results obtained during phase II (13). Pexa-Vec has been used to treat intravenously one MPM patients that benefit of a partial remission for more than ten weeks (14). Given that MPM is resistant to all conventional treatments, oncolytic VV may represent a promising therapeutic approach.

Acknowledgements

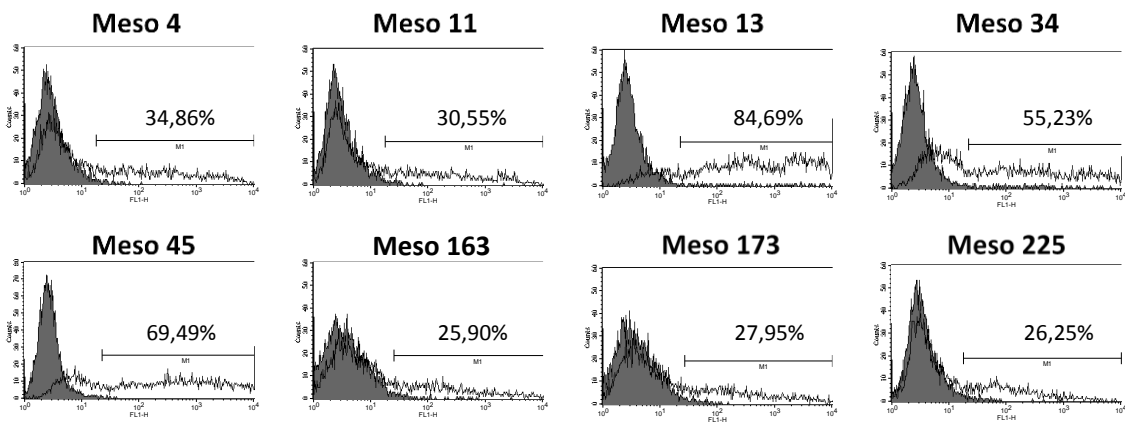
We thank Philippe Hulin and the cellular and tissular core facility of Nantes University (MicroPiCell) for their expertise in video microscopy. We thank Juliette Desfrançois and the core facility of flow cytometry (Cytocell). This work was supported by “La Ligue Régionale Grand Ouest contre le Cancer” (CSIRGO: CD16, CD22, CD44, CD49, CD72, CD79 and CD85), “l’association ARSMESO44 ”, “La fondation ARC”, “la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM)”. This work was performed in the context of the “LabEX IGO program supported by the National Research Agency via the investment of the future program ANR-11-LABX-0016-01”.

Figure legends

A



B



C

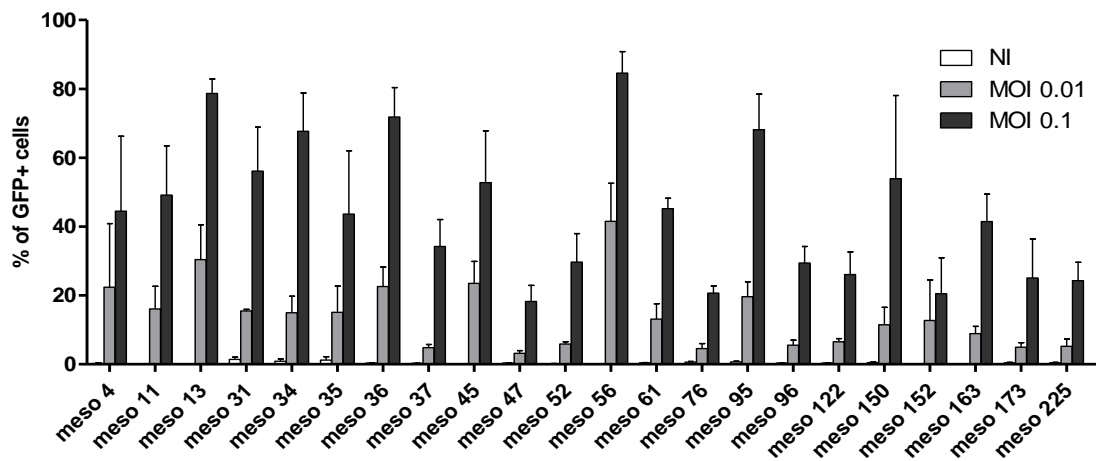


Figure 1: human MPM cell lines are sensitive to VVTK-RR-/GFP infection. (A) Meso4, 11, 13, 34, 45, 163, 173 and 225 human MPM cell lines were cultured with VVTK-RR-/GFP at MOI of 0.1 during 96h. Pictures were taken at 0h, 6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h and 96h. (B) Meso4, 11, 13, 34, 45, 163, 173 and 225 human MPM cell lines were cultured alone or with VVTK-RR-/GFP at an MOI of 0.01 or 0.1 during 24h. GFP fluorescence was analyzed by flow cytometry. (C) 22 human MPM cell lines were cultured with VVTK-RR-/GFP at MOI of 0.01 and 0.1 during 24h. GFP fluorescence was analyzed by flow cytometry. Histogram represents means \pm SEM of three independent experiments.

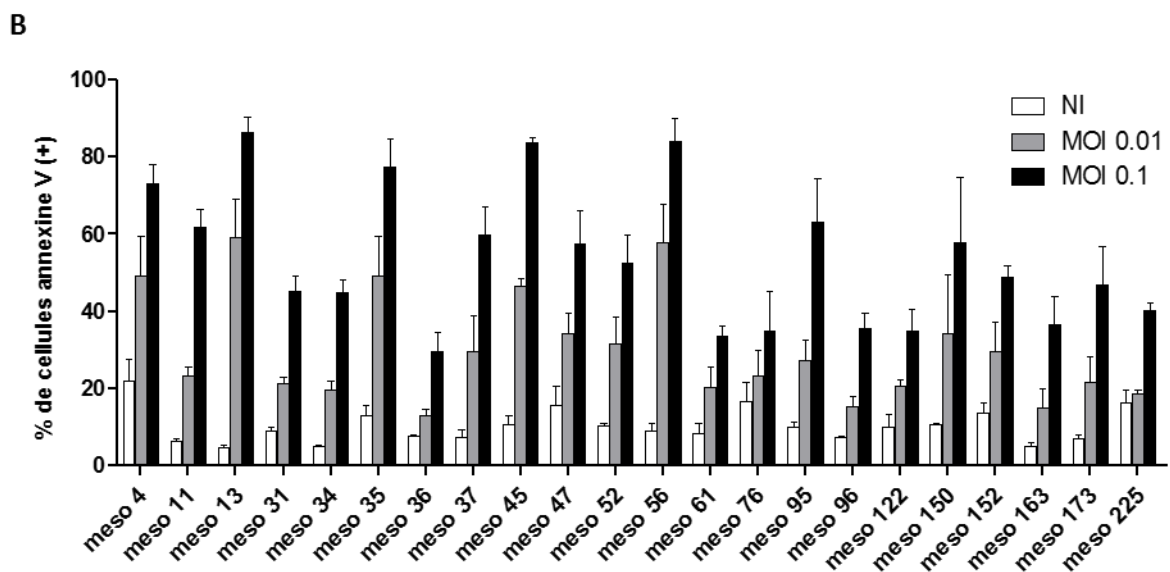
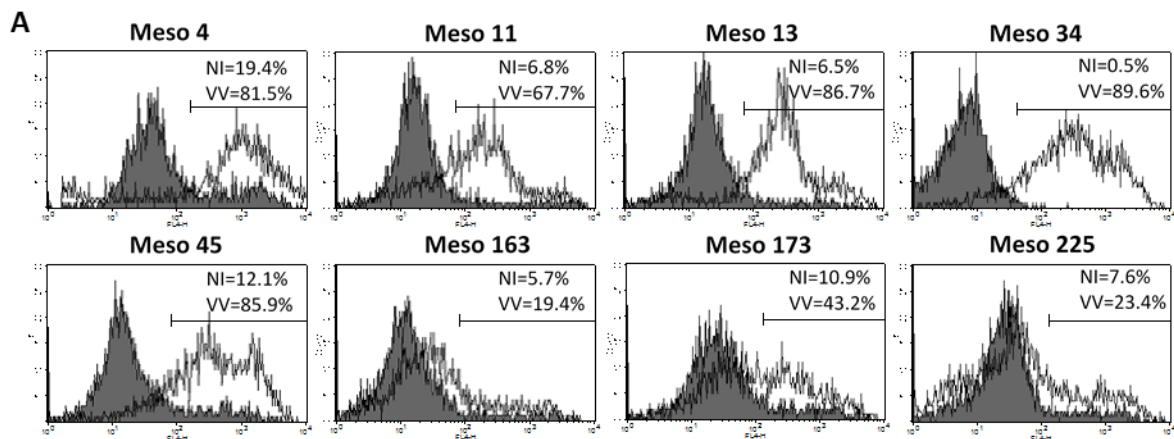


Figure 2: human MPM cell lines are sensitive to VVTK-RR-/GFP oncolytic activity. (A) Meso4, 11, 13, 34, 45, 163, 173 and 225 human MPM cell lines were cultured alone or with VVTK-RR-/GFP at MOI of 0.1 during 48h. Cells were labeled with annexin V-APC and propidium iodide. Annexin V-APC fluorescence was analyzed by flow cytometry. Grey histograms represent cells cultured alone and white histogram cells cultured with VVTK-RR-/GFP. (B) 22 human MPM cell lines were cultured with VVTK-RR-/GFP at MOI of 0.01 and 0.1 during 48h. Cells were labeled with annexin V-APC and propidium iodide. Annexin V-APC fluorescence was analyzed by flow cytometry. Histogram represents means \pm SEM of three independent experiments.

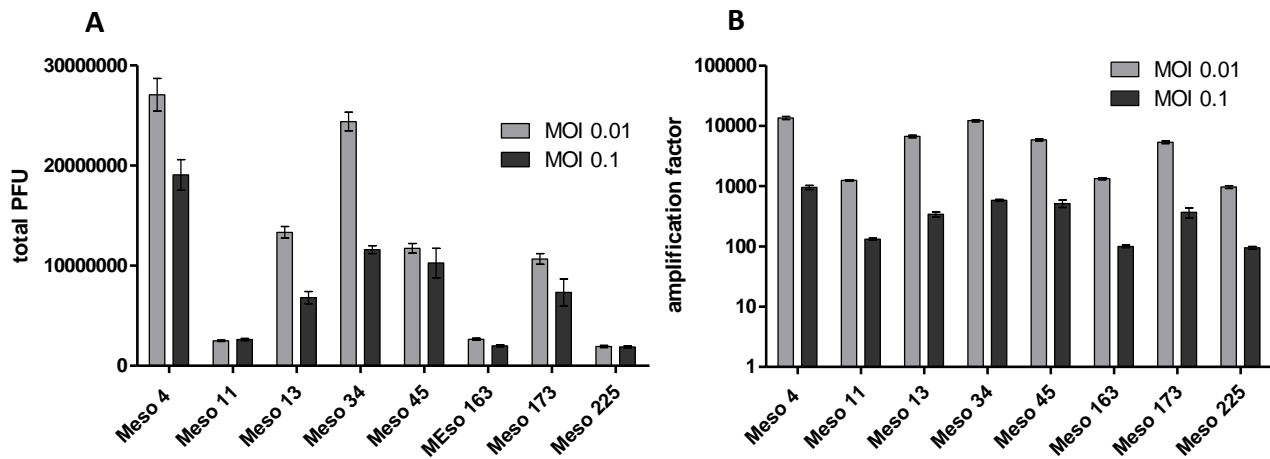


Figure 3: human MPM cell lines are permissive to VVTK-RR-/GFP infection.

Meso4, 11, 13, 34, 45, 163, 173 and 225 human MPM cell lines were cultured with VVTK-RR-/GFP at MOI of 0.1 during 48h. Culture supernatants were then collected and presence of VVTK-RR-/GFP infectious particle was measured by PFU assay. (A) Histogram represents the PFU found in the supernatants. (B) Histogram represents the amplification factor determined by dividing the PFU found in the supernatants by the PFU used at the start of the experiments.

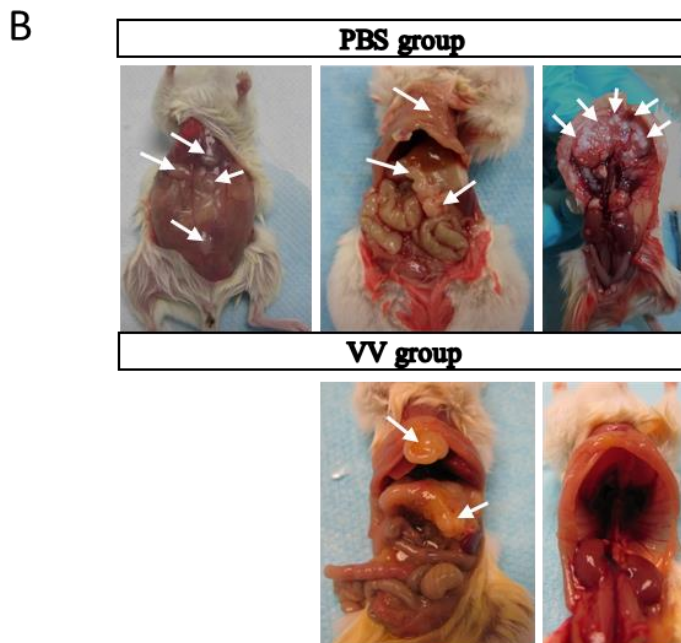
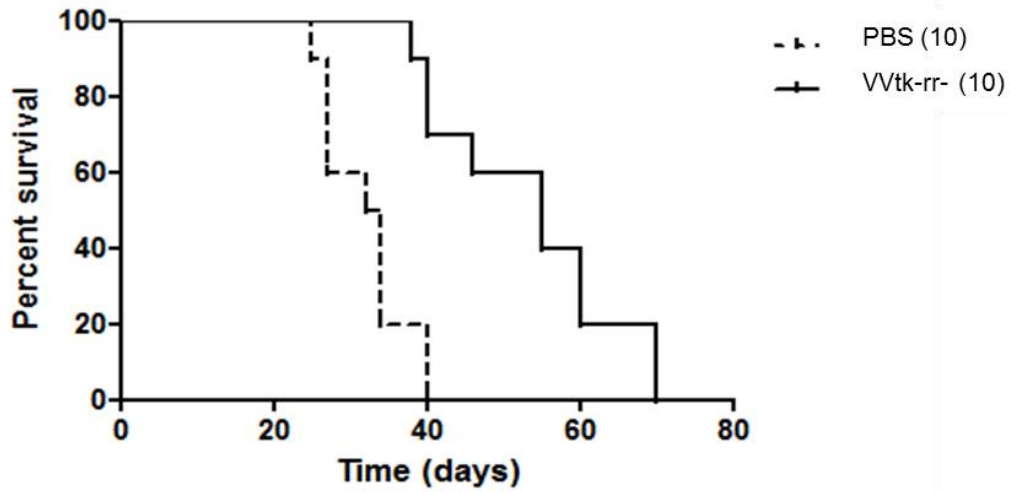


Figure 4: one intraperitoneal injection of VVTK-RR-/GFP increases survival of NOD scid mice engrafted with the human MPM cell line Meso163 and decreases tumors formations. NOD scid mice were challenged intraperitoneally with $5 \cdot 10^6$ Meso163 human MPM cells. After 3 weeks, at day 0, PBS or VVTK-RR-/GFP ($1 \cdot 10^7$ PFU) was injected intraperitoneally. (A) Graph represents survival of NOD scid mice. (B) Autopsies of a representative NOD scid mice engrafted with the human MPM cell line Meso163 and treated with PBS or VVTK-RR-/GFP. Arrows indicates tumors.

References

1. Yap TA, Aerts JG, Popat S, Fennell DA. Novel insights into mesothelioma biology and implications for therapy. *Nature reviews Cancer*. 2017;17(8):475-88. doi: 10.1038/nrc.2017.42. PubMed PMID: 28740119.
2. Atherton MJ, Evgin L, Keller BA, Shenouda MM, Stephenson KB, Vile RG, et al. Infectious optimism following the 10th international oncolytic virus meeting. *Molecular therapy: oncolytics*. 2017;7:12-6.
- 3 Haddad D. Genetically Engineered Vaccinia Viruses As Agents for Cancer Treatment, Imaging, and Transgene Delivery. *Frontiers in oncology*. 2017;7:96. doi: 10.3389/fonc.2017.00096. PubMed PMID: 28589082; PubMed Central PMCID: PMC5440573.
4. Heinrich B, Klein J, Delic M, Goepfert K, Engel V, Geberzahn L, et al. Immunogenicity of oncolytic vaccinia viruses JX-GFP and TG6002 in a human melanoma in vitro model: studying immunogenic cell death, dendritic cell maturation and interaction with cytotoxic T lymphocytes. *OncoTargets and therapy*. 2017;10:2389-401. doi: 10.2147/OTT.S126320. PubMed PMID: 28496337; PubMed Central PMCID: PMC5422459.
5. Gueugnon F, Leclercq S, Blanquart C, Sagan C, Cellerin L, Padieu M, et al. Identification of novel markers for the diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *The American journal of pathology*. 2011;178(3):1033-42. doi: 10.1016/j.ajpath.2010.12.014. PubMed PMID: 21356356; PubMed Central PMCID: PMC3070574.
6. Erbs P, Findeli A, Kintz J, Cordier P, Hoffmann C, Geist M, et al. Modified vaccinia virus Ankara as a vector for suicide gene therapy. *Cancer gene therapy*. 2008;15(1):18-28. doi: 10.1038/sj.cgt.7701098. PubMed PMID: 17992203.
7. Foloppe J, Kintz J, Futin N, Findeli A, Cordier P, Schlesinger Y, et al. Targeted delivery of a suicide gene to human colorectal tumors by a conditionally replicating vaccinia virus. *Gene therapy*. 2008;15(20):1361-71. doi: 10.1038/gt.2008.82. PubMed PMID: 18480846.
8. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*. 2012;9(7):676-82. doi: 10.1038/nmeth.2019. PubMed PMID: 22743772; PubMed Central PMCID: PMC3855844.
9. Kelly KJ, Woo Y, Brader P, Yu Z, Riedl C, Lin SF, et al. Novel oncolytic agent GLV-1h68 is effective against malignant pleural mesothelioma. *Human gene therapy*. 2008;19(8):774-82. doi: 10.1089/hum.2008.036. PubMed PMID: 18754710; PubMed Central PMCID: PMC2940611.
10. Achard C, Boisgerault N, Delaunay T, Roulois D, Nedellec S, Royer PJ, et al. Sensitivity of human pleural mesothelioma to oncolytic measles virus depends on defects of the type I interferon response. *Oncotarget*. 2015;6(42):44892-904. doi: 10.18632/oncotarget.6285. PubMed PMID: 26539644; PubMed Central PMCID: PMC4792599.
11. Waibler Z, Anzaghe M, Frenz T, Schwantes A, Pohlmann C, Ludwig H, et al. Vaccinia virus-mediated inhibition of type I interferon responses is a multifactorial process involving the soluble type I interferon receptor B18 and intracellular components. *Journal of virology*. 2009;83(4):1563-71. doi: 10.1128/JVI.01617-08. PubMed PMID: 19073732; PubMed Central PMCID: PMC2643777.
12. Fend L, Yamazaki T, Remy C, Fahrner C, Gantzer M, Nourtier V, et al. Immune Checkpoint Blockade, Immunogenic Chemotherapy or IFN-alpha Blockade Boost the Local and Abscopal Effects

of Oncolytic Virotherapy. *Cancer research*. 2017;77(15):4146-57. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2165. PubMed PMID: 28536278.

13. Heo J, Reid T, Ruo L, Breitbach CJ, Rose S, Bloomston M, et al. Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer. *Nature medicine*. 2013;19(3):329-36. doi: 10.1038/nm.3089. PubMed PMID: 23396206; PubMed Central PMCID: PMC4268543.

14. Breitbach CJ, Burke J, Jonker D, Stephenson J, Haas AR, Chow LQ, et al. Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans. *Nature*. 2011;477(7362):99-102. doi: 10.1038/nature10358. PubMed PMID: 21886163.

Article n°3: Oncolytic viruses sensitize human tumor cells for NY-ESO-1 tumor antigen recognition by CD4+ effector T cells.

Tiphaine Delaunay, Mathilde Violland, Nicolas Boisgerault, Soizic Dutoit, Virginie Vignard, Christian Munz, Monique Gannagé, Brigitte Dréno, Kristine Vaivode, Dace Pjanova, Nathalie Labarriere, Yaohe Wang, E. Antonio Chiocca, Fabrice Le Boeuf, John C. Bell, Philippe Erbs, Frederic Tangy, Marc Grégoire, and Jean-Francois Fonteneau.

Introduction :

L'immunothérapie oncolytique stimule l'initiation de la réponse immunitaire antitumorale, en induisant notamment la libération d'antigènes tumoraux (TAA) et des signaux de danger des cellules tumorales infectées. Cette libération permet une présentation croisée des TAA par des cellules présentatrices d'antigènes. L'implication directe et le mécanisme d'action des virus oncolytiques (OV) sur la phase effectrice de la réponse antitumorale est en revanche peu décrite dans la littérature. Dans cette étude, nous avons voulu déterminer l'effet des OV sur la présentation des TAA par les cellules tumorales elles-mêmes et sur leur reconnaissance par des lymphocytes T effecteurs. Dans une première étude en collaboration avec l'équipe des Dr. C Münz et M Gannagé, nous avons montré qu'une lignée (NY-ESO-1 pos/HLA-DP4 neg) vivante ou sous forme de débris cellulaires sécrète NY-ESO-1 qui est recapturé par les cellules avoisinantes vivantes (NY-ESO-1 pos/HLA-DP4 neg), présenté à un clone de lymphocytes T effecteurs CD4 + spécifique du complexe HLA-DP4/NY-ESO-1⁽¹⁵⁵⁻¹⁷⁰⁾: le clone NY67. Nous avons donc émis l'hypothèse que la mort des cellules de mélanome provoquée par un virus oncolytique induirait fortement ce mécanisme de recapture de l'antigène NY-ESO-1 et faciliterait par conséquent la reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes T effecteurs spécifiques.

Méthodes :

Dans cette étude, nous avons infecté des lignées de mélanome par différents OV: le virus de la rougeole (MV), le virus de la vaccine (VV), le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), le virus de l'herpès simplex type I (HSV), l'adénovirus (AdV) ou l'entérovirus (EV). La réplication virale a été suivie par vidéomicroscopie et la mort des cellules tumorales induite par les OV a

été mesurée par cytométrie en flux. La libération de l'antigène de tumeur NY-ESO-1 par les cellules tumorales mourantes a été analysée par western blot.

Afin de tester si NY-ESO-1 est recapturé par les cellules tumorales et présenté par leurs molécules HLA de classe II, nous avons utilisé le clone NY67 qui est un clone de lymphocyte T CD4+ cytotoxique spécifique du complexe HLA-DP4 / NY-ESO-1⁽¹⁵⁷⁻¹⁷⁰⁾. Nous avons mesuré sa production d'IFN- γ qui témoigne de la présence de ce complexe à la surface des lignées de mélanome. Nous avons aussi testé l'activité cytotoxique de ce clone par un test de relargage du chrome 51. Nous avons utilisé deux modèles de co-culture de cellules tumorales pour mettre en évidence le transfert de l'antigène NY-ESO-1: un modèle allogénique et un modèle autologue. Le modèle allogénique permet de montrer le transfert de NY-ESO-1 à partir d'une lignée qui exprime seulement l'antigène vers une lignée qui exprime seulement la molécule HLA-DP4. Dans ce modèle nous testons si le fait de tuer la lignée exprimant NY-ESO-1 par des OV permet à l'autre lignée de présenter l'antigène au clone NY67. Dans le modèle autologue, nous utilisons une lignée qui exprime la molécule HLA-DP4, mais qui exprime faiblement NY-ESO-1 et qui est donc peu reconnu par le clone NY67. Grâce à ce modèle, nous testons si le fait de tuer cette lignée par les OV augmente sa capacité à présenter l'antigène NY-ESO-1 au clone NY67.

Résultats : Tout d'abord, nous avons mesuré l'expression de HLA-DP4 et de NY-ESO-1 dans les différentes lignées de mélanome utilisées dans cette étude. Nous avons aussi caractérisé le clone NY67 en séquençant la région hypervariable de son TCR ce qui a permis de démontrer sa clonalité. Ensuite, nous avons observé que la lyse par le MV d'une lignée tumorale qui exprime NY-ESO-1 entraîne une libération de la protéine NY-ESO-1 dans le surnageant de culture.

Dans le modèle allogénique, nous avons montré que les lignées de mélanome qui n'expriment que l'antigène NY-ESO-1 ou la molécule HLA-DP4 ne sont pas reconnues par le clone NY67. La co-culture de ces lignées n'entraîne qu'une faible reconnaissance par le clone NY67 suggérant un faible transfert de l'antigène NY-ESO-1. Par contre, si avant la co-culture, on lyse les cellules tumorales NY-ESO-1+ soit par des cycles de congélation/décongélation, soit par des virus oncolytiques, les cellules tumorales qui expriment seulement la molécule HLA-DP4 deviennent capables d'activer très fortement le clone NY67. Ce transfert de l'antigène NY-ESO-1 provoqué par la lyse virale permet aussi d'activer la cytotoxicité du clone NY67.

Dans le modèle autologue, la lignée de mélanome M6 exprime la molécule HLA-DP4 et peu NY-ESO-1. Lorsque l'on co-cultive des cellules M6 vivantes avec des cellules M6 lysées par les OV, on augmente considérablement leur capacité à activer la production d'IFN- γ et l'activité cytotoxique du clone NY67, démontrant ainsi que les OV ont provoqué un important transfert de l'antigène NY-ESO-1.

Dans les deux modèles, nous n'avons pas observé de transfert de l'antigène NY-ESO-1 en utilisant l'AdV, car celui-ci présente peu d'activité oncolytique contre les lignées tumorales utilisées dans cette étude.

Conclusion :

Ainsi, nous montrons pour la première fois un nouveau mécanisme de stimulation de la réponse immunitaire antitumorale par les virus oncolytiques au niveau de la phase effectrice. En effet, le transfert d'antigènes tumoraux, tels que NY-ESO-1, entre cellules tumorales les sensibilise à la reconnaissance directe par des lymphocytes T CD4+ effecteurs spécifiques. Ces résultats soutiennent donc largement l'utilisation des virus oncolytiques pour l'immunothérapie contre le cancer.


Oncolytic viruses sensitize human tumor cells for NY-ESO-1 tumor antigen recognition by CD4+ effector T cells.

Tiphaine Delaunay, Mathilde Violland, Nicolas Boisgerault, Soizic Dutoit, Virginie Vignard, Christian Münz, Monique Gannage, Brigitte Dréno, Kristine Vaivode, Dace Pjanova, Nathalie Labarrière, Yaohe Wang, E. Antonio Chiocca, Fabrice Le Boeuf, John C. Bell, Philippe Erbs, Frédéric Tangy, Marc Grégoire & Jean-François Fonteneau


To cite this article: Tiphaine Delaunay, Mathilde Violland, Nicolas Boisgerault, Soizic Dutoit, Virginie Vignard, Christian Münz, Monique Gannage, Brigitte Dréno, Kristine Vaivode, Dace Pjanova, Nathalie Labarrière, Yaohe Wang, E. Antonio Chiocca, Fabrice Le Boeuf, John C. Bell, Philippe Erbs, Frédéric Tangy, Marc Grégoire & Jean-François Fonteneau (2018) Oncolytic viruses sensitize human tumor cells for NY-ESO-1 tumor antigen recognition by CD4+ effector T cells., *OncoImmunology*, 7:3, e1407897, DOI: [10.1080/2162402X.2017.1407897](https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1407897)



To link to this article: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1407897>

 View supplementary material 

 Accepted author version posted online: 14 Dec 2017.
Published online: 26 Dec 2017.

 Submit your article to this journal 

 Article views: 149

 View related articles 

 View Crossmark data 

ORIGINAL RESEARCH



Oncolytic viruses sensitize human tumor cells for NY-ESO-1 tumor antigen recognition by CD4⁺ effector T cells.

Tiphaine Delaunay^{a,b}, Mathilde Violland^{a,b}, Nicolas Boisgerault^{a,b}, Soizic Dutoit^{a,b}, Virginie Vignard^{a,b}, Christian Münz^c, Monique Gannage^{c,d}, Brigitte Dréno^{a,b,e}, Kristine Vaivode^f, Dace Pjanova^f, Nathalie Labarrière^{a,b}, Yaohe Wang^{g,h}, E. Antonio Chioccaⁱ, Fabrice Le Boeuf^{j,k}, John C. Bell^{j,k}, Philippe Erbs^l, Frédéric Tangy^m, Marc Grégoire^{a,b}, and Jean-François Fonteneau^{a,b}

^aCRCINA, INSERM, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France; ^bLabex IGO, Immunology Graft Oncology, Nantes, France; ^cInstitute of Experimental Immunology, University of Zürich, Switzerland; ^dSchool of Medicine, University of Geneva, Switzerland; ^eDermatology Department, Nantes Hospital, Nantes, France; ^fLatvian Biomedical Research and Study Centre, Riga, Latvia; ^gCentre for Molecular Oncology, Barts Cancer Institute, Queen Mary University of London, London, UK; ^hNational Centre for International Research in Cell and Gene Therapy, Sino-British Research Centre for Molecular Oncology, Zhengzhou University, China; ⁱHarvey Cushing Neuro-Oncology Laboratories, Department of Neurosurgery, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, USA; ^jCenter for Innovative Cancer Therapeutics, Ottawa Hospital Research Institute, Ottawa, Canada; ^kUniversity of Ottawa, Ottawa, Canada; ^lTransgene, Illkirch, France; ^mUnité de Génomique Virale et Vaccination, Institut Pasteur, CNRS UMR-3569, Paris, France

ABSTRACT

Oncolytic immunotherapy using oncolytic viruses (OV) has been shown to stimulate the antitumor immune response by inducing the release of tumor-associated antigens (TAA) and danger signals from the dying infected tumor cells. In this study, we sought to determine if the lysis of tumor cells induced by different OV: measles virus, vaccinia virus, vesicular stomatitis virus, herpes simplex type I virus, adenovirus or enterovirus, has consequences on the capacity of tumor cells to present TAA, such as NY-ESO-1. We show that the co-culture of NY-ESO-1^{neg}/HLA-DP4^{pos} melanoma cells with NY-ESO-1^{pos}/HLA-DP4^{neg} melanoma cells infected and killed by different OV induces an intercellular transfer of NY-ESO-1 that allows the recognition of NY-ESO-1^{neg}/HLA-DP4^{pos} tumor cells by an HLA-DP4/NY-ESO-1₍₁₅₇₋₁₇₀₎-specific CD4⁺ cytotoxic T cell clone, NY67. We then confirmed this result in a second model with an HLA-DP4⁺ melanoma cell line that expresses a low amount of NY-ESO-1. Recognition of this cell line by the NY67 clone is largely increased in the presence of OV productive infection. Altogether, our results show for the first time another mechanism of stimulation of the anti-tumor immune response by OV, via the loading of tumor cells with TAA that sensitizes them for direct recognition by specific effector CD4⁺ T cells, supporting the use of OV for cancer immunotherapy.

ARTICLE HISTORY

Received 9 June 2017
Revised 14 November 2017
Accepted 15 November 2017

KEYWORDS

Oncolytic immunotherapy;
Oncolytic Viruses; Melanoma;
CD4⁺ T Lymphocytes;
Tumor-Associated Antigens

Introduction

Oncolytic immunotherapy is based on the use of oncolytic viruses (OV) for the treatment of cancer. OV are non-pathogenic replicative viruses that have been attenuated, selected and/or modified to infect and kill preferentially or exclusively tumor cells without harming healthy cells (1). Furthermore, infection of tumor cells by OV results in immunogenic cell death that can initiate or reinforce the antitumor immune response (2–4). Indeed, the combination of damage-associated molecular patterns (DAMP), pathogen-associated molecular patterns (PAMP), tumor-associated antigens (TAA) and possibly type I interferon (IFN) and other pro-inflammatory cytokines released by the dying tumor cell following productive infection by OV activates antigen-presenting cells such as dendritic cells (DC) that become able to initiate anti-tumor T cell responses by presentation of TAA from dying tumor cells.

Numerous TAA expressed by tumor cells and recognized by T cells have been identified since the middle of the

1990s (5). They have been classified in several families: mutated, tumor-specific, differentiation, overexpressed and aberrantly expressed. Tumor-specific TAA, also known as cancer-germline antigens, share with mutated neo-antigens interesting properties for cancer immunotherapy, such as a specific expression by tumor cells and specific T cell repertoires of high functional avidities, not impacted by negative selection. Besides these properties their expression is shared by a variety of tumors, reinforcing their interest. Among the tumor-specific TAA, New York esophageal squamous cell carcinoma 1 antigen (NY-ESO-1) has been shown to be expressed in several types of cancer such as melanoma. This TAA holds great promises for immunotherapy, as it is one of the most immunogenic and can be spontaneously recognized in patients not only by cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes, but also by CD4⁺ T cells and B lymphocytes (6,7). For instance, it has been reported that the adoptive transfer of an autologous HLA-DP4/NY-ESO-1₍₁₅₇₋₁₇₀₎

specific CD4+ T cell clone in a metastatic melanoma patient led to rejection of tumors associated with the emergence of other tumor-specific T cells suggesting an induction of “antigen spreading” (8). Furthermore, the adoptive transfer of T cells expressing a transgenic T cell receptor against NY-ESO-1 allows clinical benefits in cancer patients (9,10). Thus, all strategies aiming at increasing the presentation of this TAA by DC and tumor cells should be envisaged to stimulate the antitumor immune response.

Recently, we used an HLA-DP4/NY-ESO-1₍₁₅₇₋₁₇₀₎-specific CD4+ cytotoxic T cell clone, NY67, to elucidate how NY-ESO-1, a cytoplasmic protein, can generate the NY-ESO-1₍₁₅₇₋₁₇₀₎ peptide that is presented by the HLA-DP4 molecule on the surface of melanoma cells (11). Contrary to other endogenous antigens that reach the HLA class II presentation pathway by autophagy (12), we showed that NY-ESO-1 reaches the classical exogenous HLA class II presentation pathway by intercellular transfer after being released and then recaptured by tumor cells (11). Indeed, we used an allogeneic model composed of an NY-ESO-1^{pos}/HLA-DP4^{neg} melanoma cell line as NY-ESO-1 donor and an NY-ESO-1^{neg}/HLA-DP4^{pos} melanoma cell line as presenting cell line. These cells are not recognized by the NY67 clone when they are cultured separately, but induce IFN- γ production by NY67 when they are cultured together. Activation of the NY67 clone, which demonstrates presentation of the NY-ESO-1₍₁₅₇₋₁₇₀₎ peptide by the HLA-DP4 molecule, can be increased if the presenting cells are co-cultured with a lysate of donor cells that favors intercellular transfer of NY-ESO-1 from donor to presenting cells. This presentation is dependent of a functional rab7, thus dependent of fusion of late endosome with lysosomes.

In this study, we sought to determine if the release of a TAA, such as NY-ESO-1, by tumor cells that are killed following a productive OV infection has consequences on recognition of tumor cells by T cells such as the NY-ESO-1-specific NY67 clone. We studied six different OV: measles virus (MV), vaccinia virus (VV), vesicular stomatitis virus (VSV), herpes simplex type I virus (HSV), adenovirus (AdV) and enterovirus (EV). In the allogeneic model, we show that when the donor cells are sensitive to an OV, NY-ESO-1 is released and captured by presenting cells that become able to present the NY-ESO-1₍₁₅₇₋₁₇₀₎ peptide to NY67. Then, we confirmed this result with an autologous model using an HLA-DP4+ melanoma cell line that expresses NY-ESO-1 at a low level. This cell line is weakly recognized by the NY67 clone. When this cell line is co-cultured with autologous tumor cells that were previously lysed by an OV, the recognition of NY-ESO-1 by NY67 is strongly increased. Finally, we show that this intercellular transfer of NY-ESO-1 sensitizes HLA-DP4+ tumor cells for cytotoxic activity of the NY67T cell clone. Altogether, these results show for the first time that OV have a positive effect, not only on the initiation phase of the antitumor immune response, but also on its effector phase by favoring the presentation of antigens by HLA class II molecules and thus the recognition of tumor cells by cytotoxic CD4+ T cells.

Results

Expression of NY-ESO-1 and HLA-DP by melanoma tumor cell lines.

Recently, using an allogeneic model, we showed that the HLA-DP4^{neg} A549 lung adenocarcinoma cell line transfected with a plasmid that encodes NY-ESO-1 (NY-ESO-1 donor cell line) releases NY-ESO-1 proteins that can be captured by the HLA-DP4^{pos} M199 melanoma cell line (presenting cell line). This cell line can then present the NY-ESO-1₍₁₅₇₋₁₇₀₎ peptide by the HLA-DP4 molecule to an HLA-DP4/NY-ESO-1₍₁₅₇₋₁₇₀₎-specific CD4+ T cell clone, NY67 (11).

To assess if the Schwarz strain of measles virus (MV) or other OV can influence this intracellular transfer of TAA and their presentation by tumor cells, we used a different allogeneic model composed of the HLA-DP4^{neg} melanoma cell line M18 as NY-ESO-1 donor and two HLA-DP4^{pos} melanoma cell lines M88 and M199 as presenters (Table 1). We measured the expression of HLA-DP molecules by these three melanoma cell lines using a pan-HLA-DP specific monoclonal antibody that recognizes all variant of HLA-DP (Fig. 1A and 1B). M18 and M199 expressed HLA-DP molecules at a low level and M88 at a moderate level. HLA-DP expression was greatly increased on the three cell lines by a treatment with gamma interferon (IFN- γ). Then we measured NY-ESO-1 expression by RT-PCR (Fig. 1C). M18 expressed spontaneously high levels of NY-ESO-1, whereas M88 and M199 expressed low levels.

In addition to this allogeneic model, we also set up an autologous model in which the melanoma cell line M6 was at the same time the NY-ESO-1 donor and presenting cell line. Indeed, M6 expressed the HLA-DP protein on its surface that can be increased by exposure of the tumor cells to IFN- γ (Table 1, fig. 1A and 1B). By RT-PCR, we measured that this cell line expressed moderate levels of NY-ESO-1 compared to the other cell lines (Fig. 1C).

Recognition of melanoma cell lines by the NY67 CD4+ T cell clone

To determine if the four melanoma cell lines are able to present the NY-ESO-1₍₁₅₇₋₁₇₀₎ peptides on the HLA-DP4 molecules, we used the human CD4+ T cell clone NY67. We first checked that NY67 obtained by limiting dilution cloning is actually clonal by sequencing the complementarity determining regions 3 (CDR3) of the two chains α and β of the T cell receptor (TCR). We found only one CDR3 region for each chain (Fig. 2A). This result confirms that NY67 is clonal.

We then measured the capacity of the four melanoma cell lines to present the NY-ESO-1₍₁₅₇₋₁₇₀₎ peptide to the NY67 clone. In absence of exogenous peptide, only M6 was recognized by a small fraction (15.12% \pm 4.1% of CD4+IFN- γ + cells) of the NY67 CD4+ T cell clone (Fig. 2B and fig. 2C). This recognition

Table 1. HLA-DPB1 allelic typing of melanoma cell lines.

M6	HLA-DPb1*0301 HLA-DPb1*0401
M18	HLA-DPb1*0201 HLA-DPb1*0301
M88	HLA-DPb1*0201 HLA-DPb1*0401
M199	HLA-DPb1*0301 HLA-DPb1*0401

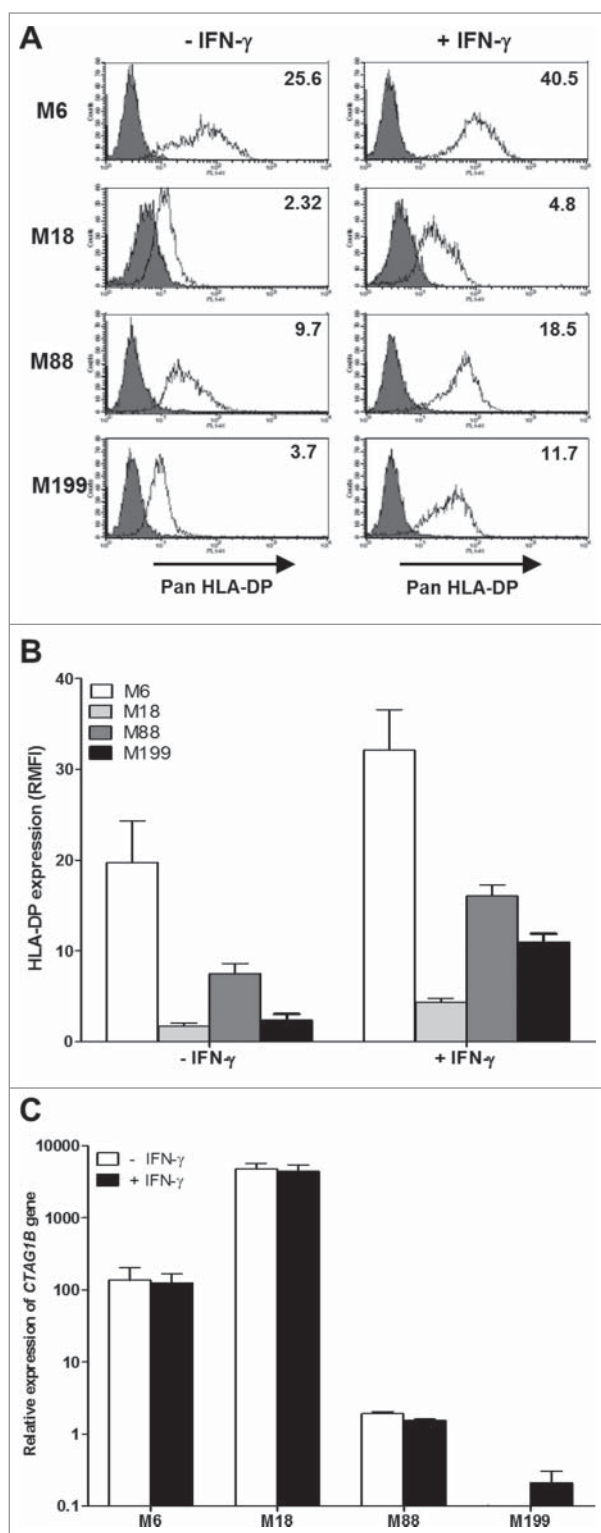


Figure 1. HLA-DP and NY-ESO-1 expression by melanoma cell lines. (A) The melanoma cell lines were cultured for 24 h in the absence or presence of 500IU/mL IFN- γ and then labeled with an IgG1 isotype control antibody (grey) or a monoclonal antibody directed against HLA-DP (white) followed by a staining with a fluorescent secondary antibody. Fluorescence was analyzed by flow cytometry. RMFI is shown on histograms. (B) Results are expressed as the mean \pm SEM of RMFI of three independent HLA-DP staining experiments. (C) The melanoma cell lines were cultured for 24 h in the absence or presence of 500IU/ml of IFN- γ . Relative expression of the CTAG1B gene that encodes NY-ESO-1 was measured by RT-qPCR and determined with RPLPO gene expression used as reference. Indicated values are means \pm SEM of relative expression of three independent experiments.

can be enhanced (32.75% \pm 7.5% of CD4+IFN- γ + cells), if the M6 tumor cell line was previously exposed to IFN- γ to increase expression of the HLA-DP molecules. M88, which expresses moderate level of HLA-DP and low levels of NY-ESO-1, failed to activate more than 10% of the clone in absence of peptide, even when pretreated with IFN- γ . M18 and M199 cell lines were also not spontaneously recognized by the NY67 clone.

When the tumor cells were pre-incubated 1 h with the NY-ESO-1₍₁₅₇₋₁₇₀₎ peptide and washed, the NY67 clone was able to recognize the two HLA-DP4^{pos} melanoma cell lines M6, M88 and to a lower extent M199 (Fig. 2B and fig. 2C). Indeed, M6 and M88, whether pretreated or not with IFN- γ , were strongly recognized by NY67. IFN- γ -pretreated M199 subsequently loaded with the NY-ESO-1₍₁₅₇₋₁₇₀₎ peptide was also well recognized by the clone (Fig. 2B and fig. 2C). The low recognition of untreated M199 was probably due to the weak expression of HLA-DP in that condition (Fig. 1A and 1B). Untreated or IFN- γ treated HLA-DP4^{neg} M18 cell line pulsed with the NY-ESO-1₍₁₅₇₋₁₇₀₎ peptide was recognized by less than 10% of NY67.

Sensitivity of NY-ESO-1 donor melanoma cell lines to oncolytic activity of MV

In the next experiment, we measured the sensitivity of the two NY-ESO-1 donor melanoma cell lines M6 and M18 to the oncolytic activity of MV. First, we followed by microscopy for four days cultures of uninfected M6 and M18 (supplemental videos 1 and 2) or cultures of M6 and M18 in presence of MV encoding the enhanced green fluorescent protein (MV-eGFP) at a multiplicity of infection (MOI) of 2 (supplemental videos 3 and 4). Images from this experiment are presented in Fig. 3A. At 24 h post infection, both NY-ESO-1 donor melanoma cell lines became eGFP+. After 36 h, formation of syncytia was observed with both cell lines. After 48 h, both tumor cell lines started to detach from the support and to die. After 72 h, 80.7% and 69.9% of M6 and M18 cells, respectively, were eGFP+ (Fig. 3B), and 27.5% and 55.1% of M6 and M18 cells, respectively, were positive for cell death staining by annexinV and/or PI (Fig. 3C). Interestingly, after 48 h, a part of the MV-infected cells dies, bursts and releases their content, including eGFP, in the extracellular environment (supplemental videos 3 and 4).

Co-culture of the NY-ESO-1 donor cell lines killed by MV with presenting tumor cell lines induces IFN- γ production by the NY-ESO-1 specific CD4+ T cell clone NY67.

Firstly, we used the allogeneic model to determine the effects of oncolytic MV on the presentation of endogenous NY-ESO-1 by the HLA-DP4 molecules. The HLA-DP4^{pos}/NY-ESO-1^{neg} presenting cell lines M88 and M199 were not recognized by the NY67 CD4+ T cell clone whether it was pretreated with IFN- γ or not, with less than 10% of the CD4+ T cells expressing IFN- γ (Fig. 4A, 4B and 4C). The NY67 clone also failed to recognize the HLA-DP4^{neg}/NY-ESO-1^{pos} donor cell line M18 whether it was alive, lysed by 3 freeze/thaw (FT) cycles or lysed by a 72 h MV infection at MOI = 2. IFN- γ pretreatment of M18 alive, or lysed by FT cycles or MV infection did not allow recognition by NY67 (data not shown). When the presenting cell lines M88 and M199 were co-cultured with the living NY-ESO-1 donor M18, we observed a weak activation of NY67 only in response to M88 co-

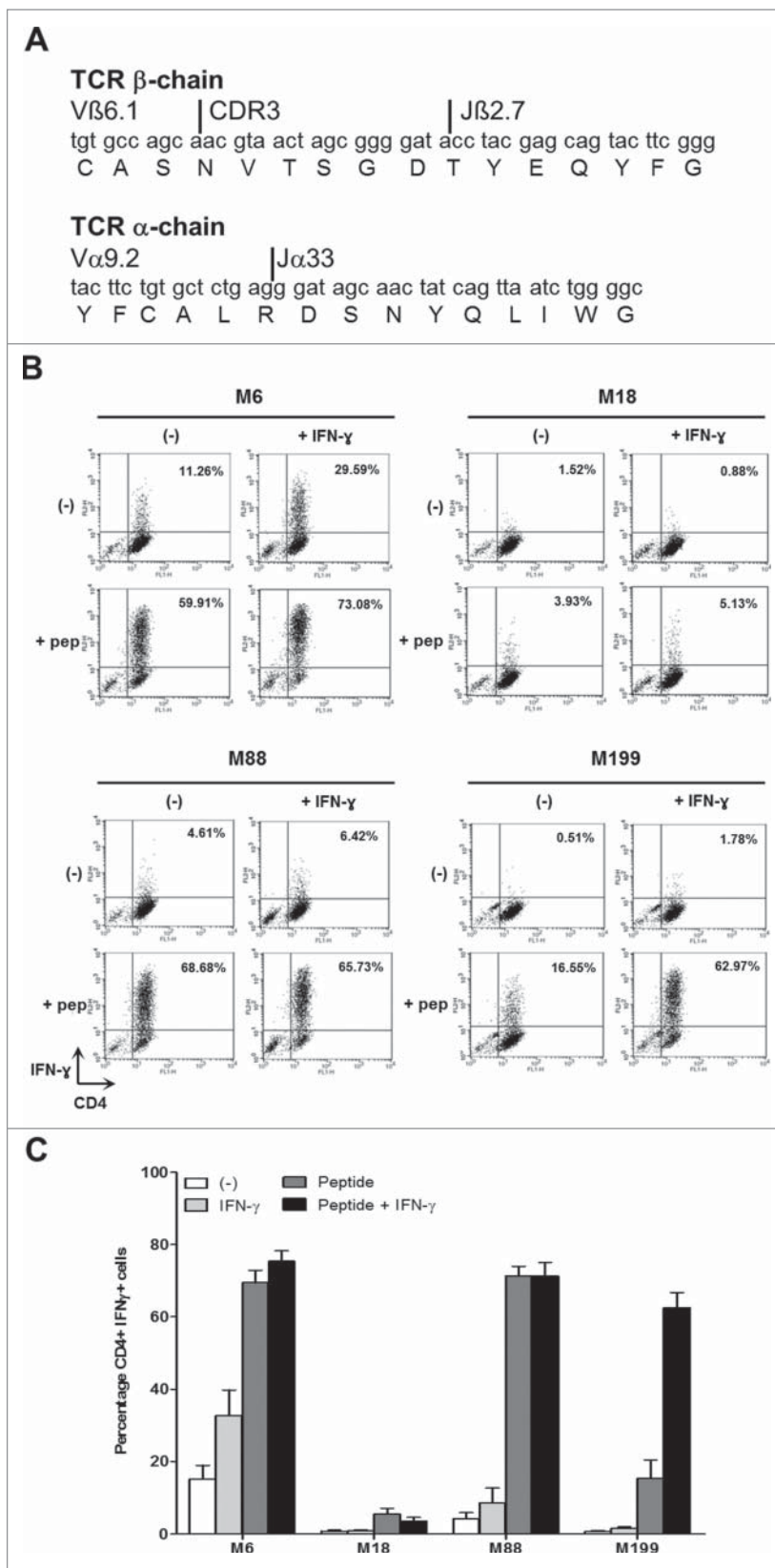


Figure 2. IFN- γ response of the CD4+ T cell clone NY67. (A) Nucleotide and amino acid sequences of the CDR3 of the beta and alpha chains of the TCR of the T cell clone NY67. (B) Melanoma cell lines were cultured in the presence or absence of IFN- γ and then loaded or not with the NY-ESO-1₍₁₅₇₋₁₇₀₎ peptide and washed. They were then cultured for 5 h with the CD4+ T cell clone NY67. IFN- γ response of the clone was measured by flow cytometry after CD4/IFN- γ staining. (C) Results are expressed as the mean \pm SEM of the percentage of IFN- γ producing CD4+ T cells obtained from three independent experiments.

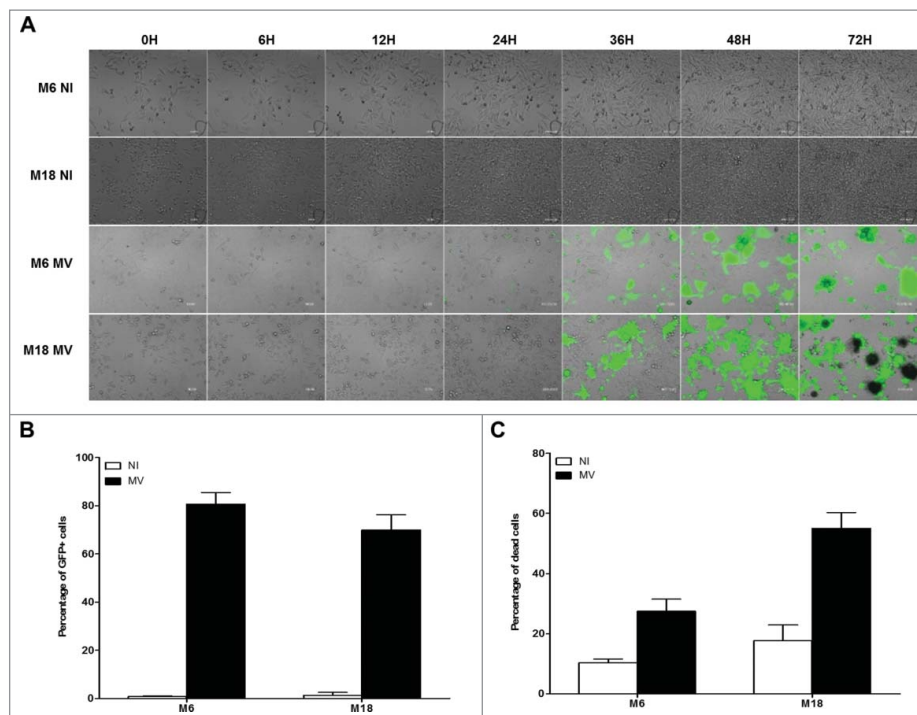


Figure 3. Melanoma cell lines are sensitive to the oncolytic activity of MV. (A) M6 and M18 melanoma lines were cultured alone (NI, not infected) or infected by MV-eGFP at an MOI of 2 (MV). Pictures were taken every 6 h during the next 72 h. (B) M6 and M18 cell lines were cultured alone (NI) or infected by MV-eGFP at MOI of 2 (MV). After 72 h, the percentage of GFP+ cells was measured by flow cytometry. Indicated values are means \pm SEM of three independent experiments. (C) M6 and M18 cell lines were cultured alone (NI) or infected by MV at MOI of 2 (MV). After 72 h cells were labeled with Annexin V-APC and propidium iodide (PI). Percentage of Annexin V+ and/or PI+ cells was measured by flow cytometry. Indicated values are means \pm SEM of three independent experiments.

cultured with M18 and IFN- γ with 23.56% \pm 12.1% of NY67 producing IFN- γ . When M88 and M199 were co-cultured with M18 lysed by FT cycles or MV infection, we observed a stronger activation of NY67 than in response to the presenting or donor cell lines alone, or the presenting cell lines co-cultured with the living donor cells. These results show that the lysis induced by MV infection, or FT cycles, allows the release of NY-ESO-1 from the donor cells that can be captured, processed and presented by presenting cell lines to the HLA-DP4/NY-ESO-1₍₁₅₇₋₁₇₀₎-specific T cell clone NY67.

Secondly, we wanted to confirm this result in an autologous model in which the NY-ESO-1^{pos}/HLA-DP4^{pos} melanoma cell line M6 is at the same time the NY-ESO-1 donor and presenting cell line (Fig. 4D and 4E). In absence of IFN- γ pretreatment, this cell line was not well recognized by the NY67 clone, since it allowed production of IFN- γ by only 14.75% (\pm 3.47%) of the CD4+ T cells. With IFN- γ pretreatment, recognition of M6 by NY67 was improved with 29.44% (\pm 12.89%) of the clone producing IFN- γ (Fig. 4E). When the NY67 clone was cultured with lysate of M6 obtained by FT cycles, no activation of NY67 was observed, since there was no remaining living cells to present HLA-DP4/NY-ESO-1₍₁₅₇₋₁₇₀₎ complexes. On the opposite, there were still some living M6 cells able to present HLA-DP4/NY-ESO-1₍₁₅₇₋₁₇₀₎ complexes when NY67 was cultured with a lysate of M6 obtained by MV infection (supplemental video 3). This activation was superior to what was observed in response to M6 alive. Finally, the coculture of M6 cell line with M6 cells lysed by FT cycles or MV infection allowed a strong presentation of HLA-DP4/NY-ESO-1₍₁₅₇₋₁₇₀₎ complexes, with more than 50% of the NY67 clone producing IFN- γ in these conditions (Fig. 4E). We

thus confirmed with the autologous model that the release of NY-ESO-1 following killing of tumor cells by MV infection allows intercellular transfer of this TAA that sensitizes alive neighboring tumor cells to recognition by NY-ESO-1-specific CD4+ T cells.

The NY67 clone develops a cytotoxic activity when stimulated. With a ⁵¹Chromium release assay, we measured if activation of NY67 by presenting cells that have captured NY-ESO-1 released by donor cells killed with MV led to the lysis of presenting cells by the clone. We found that the intercellular transfer of NY-ESO-1 induced by MV sensitizes presenting tumor cells to the cytotoxic activity of the NY67 T cell clone in both models: the allogeneic model using M18 as NY-ESO-1 donor and M88 as presenting tumor cell line (Fig. 5A) and the autologous model using the M6 tumor cell line (Fig. 5B).

MV-infected M18 tumor cells release NY-ESO-1

We measured by western blot the amount of NY-ESO-1 protein that is released in the culture supernatants of MV infected tumor cells and tumor cells lysed by freeze/thaw (FT) cycles. For M18 we observed monomers and dimers of NY-ESO-1 protein at 20 Kd and 40 kd respectively in the supernatants of FT M18 tumor cells (Fig. 6). We observed only the dimers of NY-ESO-1 in the supernatants of MV-infected M18 tumor cells. The quantity of NY-ESO-1 released by MV infected and FT M18 tumor cells was inferior to the total quantity of NY-ESO-1 protein from M18 cellular lysate, suggesting that a part stays with cellular debris. In the culture supernatant of non-infected M18

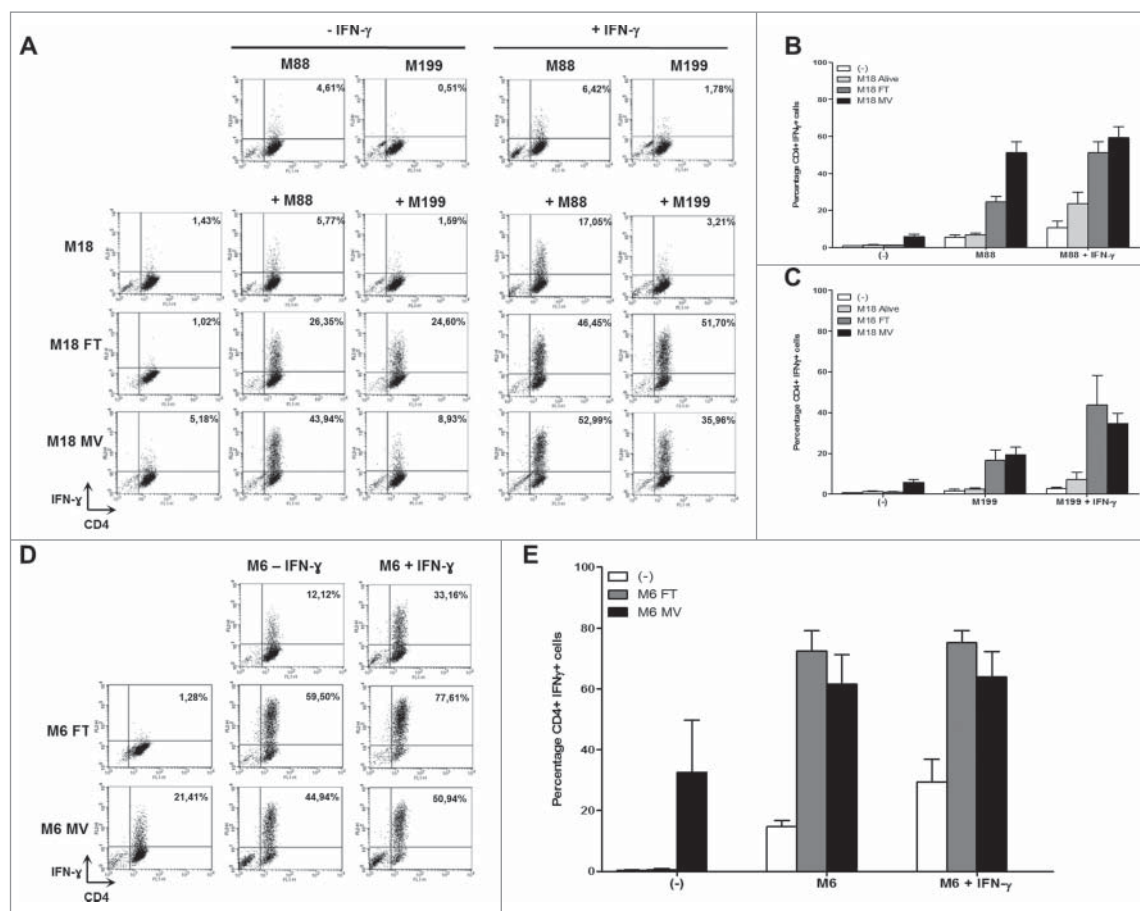


Figure 4. MV infection of the NY-ESO-1 donor cell lines sensitizes presenting cell lines to recognition by the NY-ESO-1-specific CD4⁺ T cell clone NY67. (A-E) NY-ESO-1 donor cell lines, M6 or M18, were cultured alone, infected for 3 days with MV at an MOI of 2, or underwent 3 freeze/thaw cycles (FT). They were then cultured for 24 h alone or with presenting cell lines in the presence or absence of IFN- γ . The NY-ESO-1-specific CD4⁺ T cell clone NY67 was added to these cultures in presence of brefeldin A. 5 h later, IFN- γ response of the clone was measured by flow cytometry after CD4/IFN- γ staining. (A) Example of CD4/IFN- γ staining of the clone NY67 obtained in one experiment where M18 is the NY-ESO-1 donor cell line and M88 and M199 are the presenting cell lines. (B and C) Results are expressed as mean \pm SEM of the percentage of IFN- γ -producing CD4⁺ T cells obtained from three independent experiments with M88 (B) or M199 (C) as presenting cell lines, respectively. (D) Example of CD4/IFN- γ staining of the clone NY67 obtained in one experiment where M6 is the NY-ESO-1 donor and also the presenting cell line. (E) Results are expressed as mean \pm SEM of the percentage of IFN- γ -producing CD4⁺ T cells obtained from three independent experiments with M6.

tumor cells there is only one band for bovine serum albumin that comes from the FCS used in culture medium and that catches non-specifically the NY-ESO-1 specific monoclonal antibody. For M6 tumor cell line that expresses lower level of NY-ESO-1 than M18 as measured by RT-PCR (Fig. 1), we were only able to observe a weak band of NY-ESO-1 in the M6 cellular lysate, but not in culture supernatants of MV-infected and FT M6 tumor cells (data not shown). Altogether these results suggest that small amounts of NY-ESO-1 released by MV-infected and FT tumor cells are sufficient to load the class II presentation pathway of neighboring tumor cells.

Sensitivity of NY-ESO-1 donor tumor cell lines to oncolytic activity of five other OV

Then, we tested if other OV beside MV are able to induce intercellular transfer of NY-ESO-1 to favor HLA class II presentation of this TAA. We studied five other OV: a Copenhagen vaccinia virus (VV) deleted of its thymidine kinase and ribonucleotide reductase genes and that encodes GFP (13). The VSVdelta51 (VSV) that has been developed

with a mutation in the M protein making the virus sensitive to interferon secretion, specific to tumor environment, and has shown promising efficacy against various type of tumor models (14,15); the rQNestin34.5v.1 Herpes simplex type I virus (HSV) that encodes GFP and that is modified by insertion of a nestin promoter driving expression of HSV1 ICP34.5 and GFP in the context of a deletion of ICP6 and both endogenous copies of ICP34.5 (16); oncolytic adenovirus Ad-TD-RFP (AdV) is a new generation adenovirus in which the E1ACR2, E1B19 K and E3gp19 K genes of human adenovirus type 5 were deleted and the RFP open reading frame was inserted into the E3gp19 K region; and the Rigvir (EV) that is a native enterovirus of ECHO 7 type isolated from human feces and adapted and selected for melanomas (17). VV, VSV and HSV express GFP and the AdV expresses red fluorescent protein (RFP).

Firstly, we exposed the NY-ESO-1 donor cell lines M6 and M18 to the four different OV that encode fluorescent proteins and we made pictures and movies during the next 72 h to 96 h (Fig. 7 A and supplemental videos 5 to 12). With VV (supplemental videos 5 and 6) and VSV (supplemental videos 7 and 8), we observed the first GFP⁺ tumor

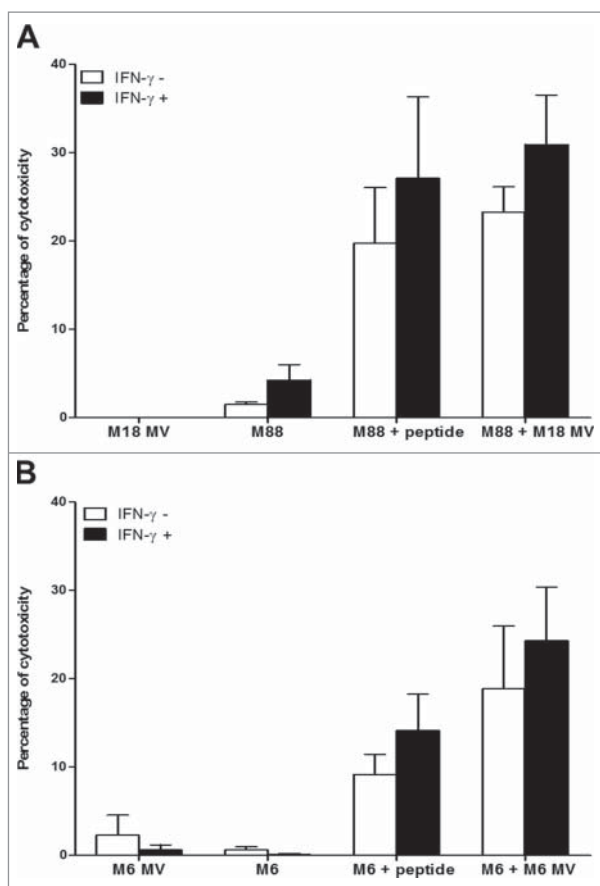


Figure 5. MV infection of the NY-ESO-1 donor cell lines sensitizes presenting cell lines to cytotoxic activity of the NY-ESO-1-specific CD4⁺ T cell clone NY67. NY-ESO-1 donor cell line (M6 or M18) were cultured alone or infected for 3 days with MV at an MOI of 2 (MV). Donor cells were then cultured 24 h alone or with the presenting cell lines (M6 or M88) in the presence or absence of IFN- γ . A part of the presenting cells were pulsed with the NY-ESO-1₍₁₅₇₋₁₇₀₎ peptide. Cells were then loaded with ⁵¹Cr and exposed for 4 h to the NY-ESO-1-specific CD4⁺ T cell clone NY67. Then, supernatants were harvested and analyzed for the presence of ⁵¹Cr. (A) results obtained using M18 as donor cell line and M88 as presenting cell line. (B) Results obtained using M6 donor and presenting cell line. Results are expressed as mean \pm SEM of percent of cytotoxicity obtained from three independent experiments.

cells after 8 h and 16 h, respectively. The fluorescence spread and by 24 h, a majority of cells were GFP⁺. Then cells started to detach from the support and died. Later, a part of the cells lost their green fluorescence by releasing the GFP in the medium. With HSV (supplemental videos 9 and 10), we observed a first wave of GFP⁺ infected cells after 12 h for M6 and 33 h for M18, but we failed to detect further waves of infection. However, we observed the spreading of a cytopathic effect on the GFP⁻ neighboring cells that detached from the support and died, especially with M6. With AdV, we failed to see RFP⁺ cells at MOI under 10 (data not shown). When we used an MOI of 100 (supplemental videos 11 and 12), we observed rare RFP⁺ cells after 32 h for M6 and 24 h with M18 and the infection did not spread to other cells. After 72 h, a majority of M6 cells were still attached to the plastic and look alive, while M18 cells started detaching and got a round shape after 24 h with some of them presenting an apoptotic morphology characterized by the formation of large vacuoles. We then quantified the cell fluorescence by flow cytometry

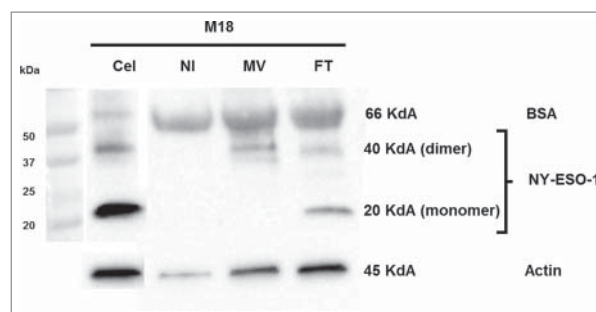


Figure 6. Release of NY-ESO-1 by MV-infected M18 tumor cells. M18 tumor cells were cultured alone (NI), infected by MV or lysed by freeze/thaw (FT) cycles. NY-ESO-1 was measured in M18 cellular lysate (20 μ g protein deposit) and supernatants of NI, MV or FT M18 tumor cells (50 μ g protein deposit). NY-ESO-1 appears as a monomer (band at 20kD) or dimer (band at 40kD).

after 72 h of exposition to the five OV encoding fluorescent proteins (Fig. 7B). The results correlate with observations by microscopy. With MV, VV and VSV, a large majority of cells were fluorescent 72 h after infection, whereas a smaller fraction of cells were fluorescent with HSV (55.74% \pm 5.7% for M6 and 25.40% \pm 5.6% for M18) and less than 16% with AdV.

We also measured the sensitivity of both NY-ESO-1 donor cell lines to EV Rigvir. This virus does not encode a fluorescent protein. To measure viral protein production after 72 h of infection, we stained the cells with a monoclonal antibody against the viral protein 1 (VP1) of EV (Fig. 7C and 7D). We found that M18 was permissive to EV infection with around 20% of VP1⁺ cells after 72 h of infection, whereas M6 was not sensitive to EV infection, with less than 1% of VP1⁺ cells.

Then, we measured cell death of both NY-ESO-1 donor cell lines induced by the six different OV after 72 h, by staining dead cells that had lost membrane permeability with TO-PRO[®]-3 (Fig. 7E). We found that all OV except EV induced a significant level of death of M6 tumor cell line, whereas all viruses induced cell death of M18. Surprisingly, we noticed that despite a relative resistance of M6 and M18 to infection by AdV, a relatively high level of TO-PRO[®]-3⁺ cells was present after 72 h. It is all the more surprising that M6 tumor cells infected with AdV looked in good shape after 72 h (supplemental video 11). Interestingly, we observed that despite a relatively low fraction of tumor cells expressing high levels of GFP 72 h after HSV infection, about half of the cells were TO-PRO[®]-3⁺, thus confirming the cytopathic effect observed by videomicroscopy (supplemental videos 9 and 10).

MV, VV, VSV, HSV and EV induce intercellular transfer of NY-ESO-1 that sensitizes tumor cells to recognition by the NY-ESO-1-specific CD4⁺ T cell clone NY67

First, we used the allogeneic model with M18 as NY-ESO-1 donor cell line and M88 as presenting cell line to determine if the different OV are able to induce the intercellular transfer and the presentation of NY-ESO-1 by HLA class II molecules (Fig. 8A, supplemental figure 1). M18 alive or exposed to the different OV, in absence or presence of IFN- γ , was never

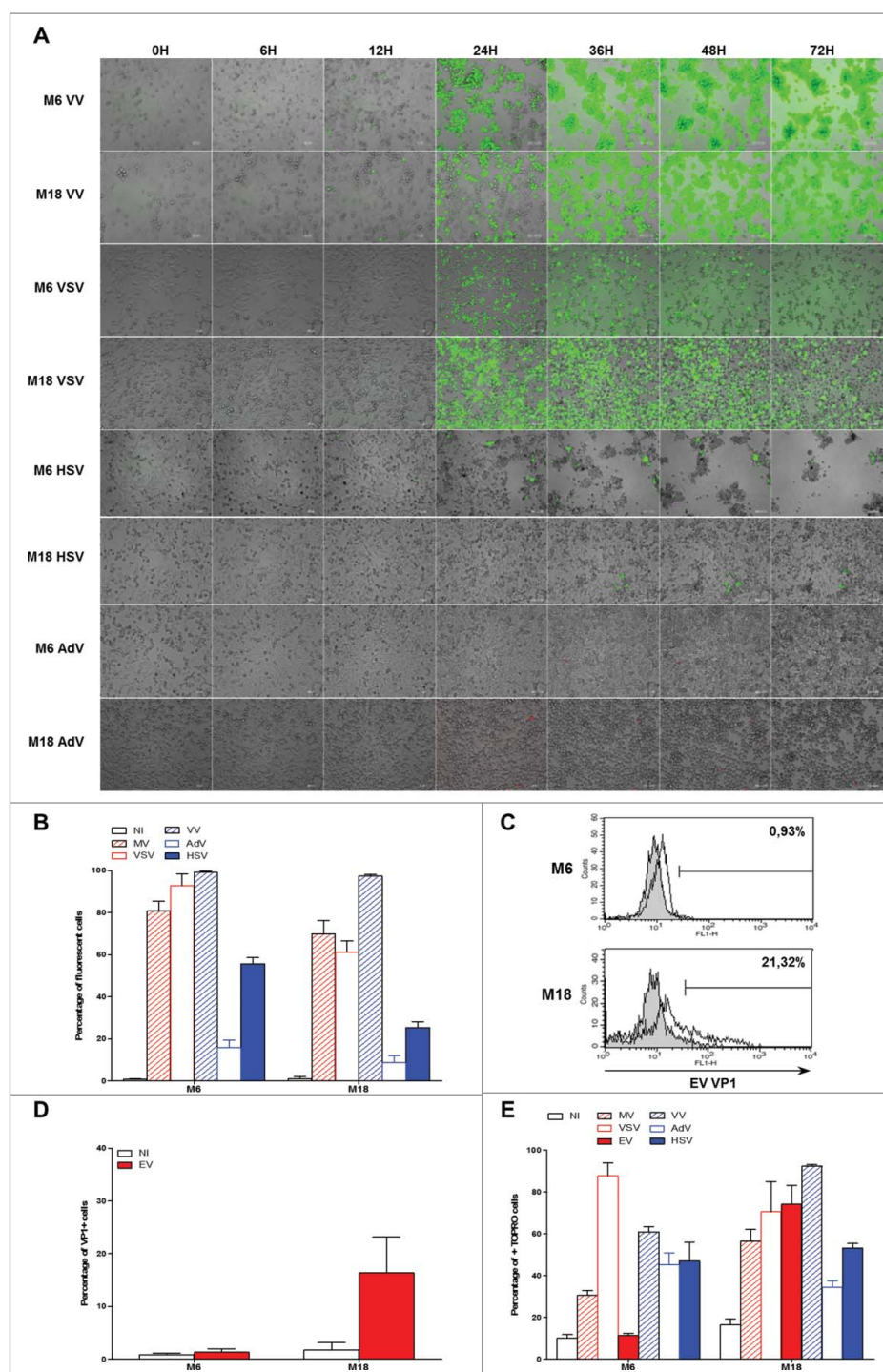


Figure 7. Sensitivity of NY-ESO-1 donor melanoma cell lines M6 and M18 to six different OV. M6 and M18 melanoma cell lines were infected with VV (MOI = 0.1), VSV (MOI = 0.01), HSV (MOI = 1), AdV (MOI = 100) during 72 h. (A) Pictures were taken every 6 h. (B) 72 h later, the percentage of GFP+ cells for MV-eGFP, VV, VSV and HSV, or RFP+ cells for AdV was measured by flow cytometry. (C and D) M6 and M18 melanoma cell lines were infected with EV (MOI = 5). 72 h later, cells were stained with an antibody against VP-1 of EV and an Alexa-488 secondary antibody. Fluorescence was measured by flow cytometry. (C) Histogram plots of control (grey) and VP1 (white) stainings. (D) Results are expressed as mean \pm SEM of three independent VP1 stainings. (E) M6 and M18 cell lines were infected with MV-eGFP (MOI = 2), VV (MOI = 0.1), VSV (MOI = 0.01), HSV (MOI = 1), AdV (MOI = 100) and EV (MOI = 5). 72 h later, cells were labeled with TO-PRO[®]-3. TO-PRO[®]-3+ cells were measured by flow cytometry. Indicated value are means \pm SEM of three independent experiments.

recognized by the NY67 clone. When M88 was co-cultured with M18 alive, a low level of activation of NY67 (inferior to 20% of CD4+IFN- γ + cells) was observed, especially when IFN- γ was present in the co-culture. When M18 was infected with the different OV, all viruses except AdV were able to induce the intercellular transfer of NY-ESO-1 and the recognition of the presenting cell M88 by NY67.

We then confirmed this result using the autologous model with M6 as NY-ESO-1 donor and presenting cell line (Fig. 8B and supplemental figure 2). M6 alone or pretreated with IFN- γ was not recognized by the NY67 clone at the difference of the previous series of experiments presented on figs. 2C and 4E, where it was weakly recognized. Nonetheless, when M6 was co-cultured with M6 that had been infected with the different OV,

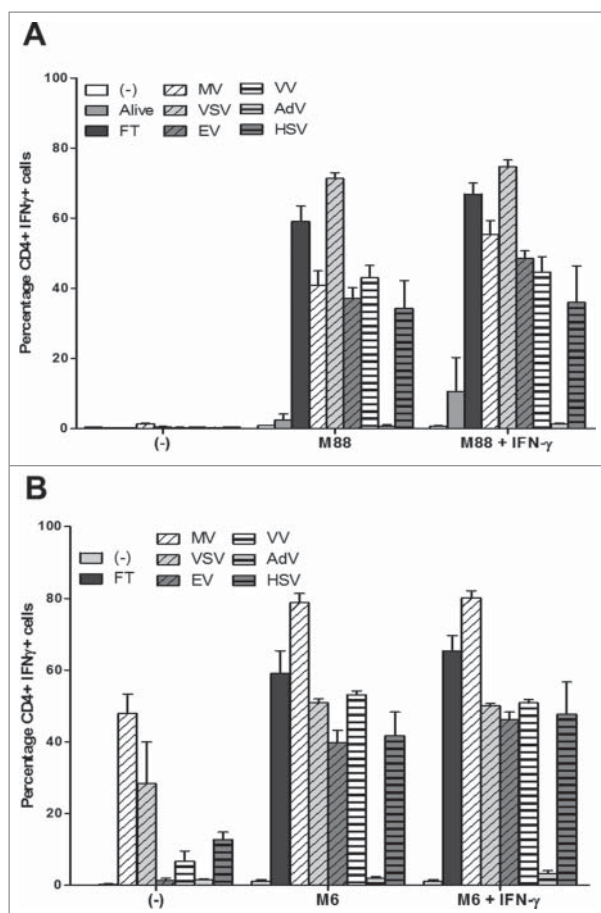


Figure 8. OV infection of the NY-ESO-1 donor cell lines sensitizes presenting cell lines to recognition by the NY-ESO-1-specific CD4⁺ T cell clone NY67. (A) The NY-ESO-1 donor cell line M18 was cultured alone, infected for 3 days with MV (MOI = 2), VSV (MOI = 0.01), EV (MOI = 5), VV (MOI = 0.1), AdV (MOI = 100), HSV (MOI = 1) or underwent 3 freeze/thaw cycles (FT). Cells were then cultured 24 h alone or with the presenting cell line M88 in the presence or absence of IFN- γ . The NY-ESO-1-specific CD4⁺ T cell clone NY67 was added to the culture in presence of brefeldin A. 5 h later, IFN- γ response of the clone was measured by flow cytometry after CD4/IFN- γ staining. (B) The NY-ESO-1 donor cell line M6 was cultured alone, infected for 72 h with MV (MOI = 2), VSV (MOI = 0.01), EV (MOI = 5), VV (MOI = 0.1), AdV (MOI = 100), HSV (MOI = 1) or underwent 3 FT cycles. Cells were then cultured 24 h alone or with the autologous presenting cell line M6 in the presence or absence of IFN- γ . The NY-ESO-1-specific CD4⁺ T cell clone NY67 was added to the culture in presence of brefeldin A. 5 h later, IFN- γ response of the clone was measured by flow cytometry after CD4/IFN- γ staining. Results are expressed as mean \pm SEM of three independent experiments.

like with the allogeneic model we observed a strong activation of the NY67 clone, except in the condition where M6 was cocultured with M6 infected by AdV. It was surprising that EV was able to induce the intercellular transfer of NY-ESO-1, since we failed to observe an oncolytic activity of this virus on M6 (Fig. 7E). We also observed that M6 infected three days with MV, VSV and to a lesser extent VV and HSV, can be directly recognized by the NY67 clone, which was probably due to a variable fraction of alive M6 cells still present in the culture and able to present NY-ESO-1 after the 3-day infection by the different OV.

Altogether these results show that lysis of tumor cells following productive infection by an OV is able to induce the release of TAA that can reach the exogenous HLA class II pathway of tumor cells for recognition by TAA-specific CD4⁺ T cell.

Discussion

In this study, we show for the first time that MV and other OV, VV, VSV, HSV and EV, when they productively infect human melanoma cells, are able to induce the release of TAA such as NY-ESO-1. These TAA can then be captured by living neighboring tumor cells, in which they reach the classical exogenous HLA class II presentation pathway through the endo-lysosomal compartment. We failed to show this capacity for oncolytic adenovirus, since this OV was poorly infecting both NY-ESO-1 donor tumor cell lines. However, this OV may probably also induce the release of NY-ESO-1 when it is able to productively infect a tumor cell. Interestingly, the HLA-DP4/NY-ESO-1₍₁₅₇₋₁₇₀₎-specific human CD4⁺ T cell clone NY67 that we used in this study develops a cytotoxic activity when activated. It allowed us to show that the intercellular transfer of NY-ESO-1 induced during tumor cell lysis by OV sensitizes tumor cells to the cytotoxic activity of the NY67 clone. This result is of great interest since it is the first demonstration that OV favor the antitumor immune response at the level of the effector phase by loading tumor cells with TAA that allow a better recognition and lysis by cytotoxic T cells.

At the difference of other OV used in this study, MV induces syncytia formation (supplemental video 3 and 4). It is thus possible that a part of NY-ESO-1 transfer is made by cell-cell fusion with MV. However, NY-ESO-1 will be transferred from one cytoplasm to another where it should fail to reach the class II presentation pathway by autophagy as we demonstrated in our previous study (11). It is likely that NY-ESO-1 has to go out the cell and then be endocytosed to reach the HLA class II presentation pathway to be presented.

It is now recognized that cancer virotherapy using OV not only relies on the killing of tumor cells following productive infection, but also on the induction of antitumor immune response due to the nature of tumor cell death induced by OV (18,19). That recently led the field to rename antitumor virotherapy as oncolytic immunotherapy. Indeed OV productive infection leads to an immunogenic cell death that induces the activation of antigen-presenting cells such as dendritic cells (DC), which can initiate the antitumor immune response. The mechanisms of this positive effect of OV on the initiation phase of the immune response against tumor cells have been well described *in vitro* by us and other with MV as a model (20–23). MV productive infection leads to the lysis of tumor cells that release TAA, but also some danger signals of both viral origin, such as the single strand RNA of MV, and cellular origin, such as the HMGB1 protein. These danger signals can activate DC that become able to cross-present TAA to cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes, whereas cross-presentation of TAA is not observed when non immunogenic apoptosis of tumor cells is induced with UV-B irradiation. This adjuvant effect of MV on the antitumor immune response has also been observed during a phase I clinical trial (24). Indeed the group of Evanthia Galanis reported the induction of T cell responses against ovarian tumor antigens after treatment of ovarian cancer patients by oncolytic Edmonston MV injected in the peritoneal cavity. In other more advanced clinical trials such as the phase II that

evaluated an oncolytic vaccinia virus, the Pexastimogene devacirepvec or Pexa-Vec, for the treatment of hepatocarcinoma (25) or the recent phase III that evaluated an oncolytic herpes simplex type I virus, the Talimogene laherparepvec or T-vec, for the treatment of metastatic melanoma (26), evidence of the stimulation of an antitumor immune response by the OV are reported and explain the regression of metastases that are distant from the site of OV injection. These adjuvant effects that favor the initiation phase of the antitumor immune response are not limited to this phase, but also extend to the effector phase by helping the loading of tumor cells with TAA.

NY-ESO-1 is one of the most promising TAA due to the fact that it induces a broad antitumor immune response with recognition by monoclonal antibodies and CD4+ and CD8+ T cells. Furthermore, clinical trials with adoptive T cell transfer targeting this antigen show a certain degree of efficacy in absence of immunomodulators such as the checkpoint inhibitors that are expected to increase it (6,8–10). Furthermore, OV-mediated increase of NY-ESO-1 epitope presentation at the surface of tumor cells to cognate T cells is particularly relevant knowing that expression of NY-ESO-1 is often very heterogeneous inside the tumor (27). Indeed, it is rare that all cancer cells express NY-ESO-1 in a tumor. Thus OV may represent a way to load tumor cells with NY-ESO-1 that fail to express this TAA, potentially allowing to make all the tumor cells sensitive to NY-ESO-1-specific T cell recognition in the tumor.

Oncolytic immunotherapy met its first success with the approval of T-Vec (Imlygic[®] from Amgen) by the US Food and Drug Administration and the European Medicines Agency for the treatment of metastatic melanoma. Several phase III clinical trials combining Imlygic with immune checkpoint inhibitors (iCPI) are on the way, since it is likely that this OV would increase efficacy of iCPI due to its stimulatory properties on the antitumor immune response. Thus, Imlygic is combined with pembrolizumab, an anti-PD-1, for treatment of unresectable stage IIIB to IVM1 c melanoma (NCT02263508) and of recurrent metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (NCT02626000). Imlygic is also combined with ipilimumab (anti-CTLA-4) for treatment of unresectable stage IIIB to IVM1 c melanoma (NCT01740297). The first clinical results obtained with a combination of Imlygic and ipilimumab support this idea with better clinical responses induced by the combination than each component used alone (28). It is thus essential to better understand how OV influence the different phases of the antitumor immune response to optimize oncolytic immunotherapy.

Materials and methods

Cell culture

Human melanoma cell lines, M6, M18, M88 and M199 were established from fragments of metastatic tumors and registered in the Biocollection PCU892-NL (CHU Nantes, France) with informed consent from patients. Allelic typing of the HLA-DPB1 chain of melanoma cell lines was performed by the “Etablissement Français du Sang” (Nantes) by PCR. All cell lines were maintained in RPMI-1640

medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 100U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin and 2 mM L-glutamine (Gibco-Invitrogen) and cultured at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Cells were routinely checked for Mycoplasma contamination (PlasmoTestTM, InvivoGen).

The NY-ESO-1-specific CD4+ T cell clone NY67 was obtained as previously described (29). The clone is cultured and maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 8% pooled human serum, 150U/ml IL-2 (Proleukin, Prometheus Laboratories Inc), 100U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin and 2 mM L-glutamine.

Real-time RT-qPCR

Melanoma cell lines were seeded in 6-well plates with 0.5×10^6 cells/well with or without 500IU/mL IFN- γ (Eurobio). 24 h later, total cell RNA was extracted using the Nucleospin[®] RNA II kit (Macherey-Nagel) and 0.5 μ g total RNA was reverse transcribed using MMLV reverse transcriptase (Invitrogen). PCR reactions were performed using QuantiTect primer assays (Qiagen) and Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions and was run on the Stratagene MX4000P thermocycler and analyzed with MxPro software. Gene expression was analyzed using QuantiTect primer pairs for CTAG1B (coding for NY-ESO-1). Results are presented relatively to the expression of a housekeeping gene that encodes the human large ribosomal protein (RPLPO).

Sequencing of the CDR3 region of the T cell receptor alpha and beta chains of the NY67 clone

RNA from 5×10^6 cells from the NY67 T cell clone was extracted with RNable reagent (Eurobio) according to the supplier's instructions and dissolved in water. Reverse transcription, PCR amplification and sequencing were performed as previously described (30). We followed the TCR nomenclature established by Arden et al (31).

Oncolytic viruses

The live-attenuated Schwarz vaccine strain of measles virus (MV) and MV recombinant for the enhanced green fluorescent protein (MV-eGFP) were produced as previously described (32). Attenuated recombinant vaccinia virus (VV) was derived from the Copenhagen strain and was deleted in the thymidine kinase and ribonucleotide reductase genes and is recombinant for the GFP. VV was propagated and titrated in chicken embryo fibroblasts as previously described (13). Delta51 vesicular stomatitis virus (VSV) recombinant for the GFP was produced as described (14,33). rQNestin34.5v.1 is an Herpes simplex type I virus (HSV) recombinant for the eGFP also expresses the viral ICP34.5 gene under control of a nestin promoter/enhancer element in the background of an ICP6 deletion and endogenous ICP34.5 gene deletions (16). Oncolytic adenovirus Ad-TD-RFP (AdV) is a new generation adenovirus in which the E1ACR2,E1B19 K and E3gp19 K genes of human

adenovirus type 5 were deleted and the RFP open reading frame was inserted into the E3gp19 K region. Rigvir (Ltd Latima, Riga, Latvia) is native enterovirus of ECHO 7 type isolated from human feces and adapted and selected for melanomas (EV) (17). EV was propagated and titrated in human fibroblast Hs68 cells (ATCC-CRL-1635). In brief, monolayers of human fibroblast Hs68 cells were infected with EV at an MOI of 5 and virus was harvested by centrifugation at 3220 g for 30 min. Virus stocks were titrated on Hs68 cells by phage assay.

Videomicroscopy

One day before infection, melanoma cells were seeded in 24-well plates with 10^5 cells/well. Cells were then infected with MV-eGFP (MOI = 2), VV (MOI = 0.1), VSV (MOI = 0.01), HSV (MOI = 1), AdV (MOI = 100) and EV (MOI = 5). The time-lapse videomicroscopy was performed using a Leica DMI6000B microscope with a 10x objective. Images were acquired every 15 or 20 minutes for 3 to 4 days. We used MetaMorph[®] Microscopy Automation & Image Analysis Software (version 7.8) and Fiji Software for acquisition and analysis (34).

Infection of tumor cells with OV

NY-ESO-1 donor cell lines M6 and M18 were seeded in 6-well plates with 0.5×10^6 cells/well and infected with MV or MV-eGFP (MOI = 2), VV (MOI = 0.1), VSV (MOI = 0.01), HSV (MOI = 1), AdV (MOI = 100) and EV (MOI = 5). After 72 h of infection, M6 and M18 were harvested for measurement of cell death and of infection by flow cytometry or for co-culture with presenting tumor cell lines M6 or M88 and M199, respectively.

Intracellular staining of IFN- γ

Presenting tumor cell lines M88 and M199 were cultured 24 h with or without 500IU/ml IFN- γ , alone or with M18 infected by the different OV or with M18 previously lyzed by 3 freeze/thaw cycles. Presenting tumor cell line M6 was cultured 24 h with or without IFN- γ , alone, with M6 cells that had been infected with different OV or M6 previously lyzed by 3 freeze/thaw cycles.

After 24 h, they were then used to stimulate the NY-ESO-1-specific CD4+ T cell clone NY67. A part of the presenting cells cultured alone were pulsed with 10 μ M NY-ESO-1₍₁₅₇₋₁₇₀₎ peptide, SLLMWITQCFLPVF (Eurogentech) during 1 h and washed three times. 10^5 presenting tumor cells were co-cultured with 10^5 T cells in presence of 10 μ g/ml of brefeldin A (Sigma-Aldrich). After 5 h, cells were fixed by PBS 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences) 10 min at room temperature and washed. Cells were stained with a FITC-conjugated anti-CD4 antibody (BD Pharmingen, clone RPA-T4) and a PE-conjugated anti-IFN- γ antibody (BD Pharmingen, clone B27) for 30 min in PBS containing 0.1% BSA (bovine serum albumin) and 0.1% saponin (Sigma-Aldrich). Fluorescence was measured by flow cytometry on a FACS Calibur (BD

Biosciences) and analyzed using the BD CellQuest[™] Pro software.

Measurement of HLA-DP expression, cell death and infection by flow cytometry

To measure HLA-DP expression on the cell surface, tumor cells were stained with an anti-HLA-DP primary monoclonal antibody (produced by the recombinant protein platform P2R-SFR François Bonamy, Nantes, clone B7.21) or an IgG1 isotype control (BD Pharmingen) and then with a secondary DyLight[™] 488 Goat anti-mouse IgG antibody (BioLegend). Relative mean of fluorescence intensity (RMFI) was calculated as follow: mean fluorescence intensity obtained from staining with anti-HLA-DP antibody divided by mean fluorescence intensity obtained from staining with the isotype control antibody.

To measure the percentage of cell death of MV-infected cells, cells were labeled with an annexinV-APC/ propidium iodide (IP) labeling kit (BD Pharmingen) according to manufacturer instructions. To measure the percentage of cell death of MV-eGFP, VV, VSV, HSV, AdV and EV infected cells, cells were labeled with TO-PRO[®]-3 iodide (Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer instructions. In parallel of the TO-PRO[®]-3 iodide assay, the percentage of infected cells was measured using GFP fluorescence for infection with MV-eGFP, VV, VSV and HSV and using RFP fluorescence for the AdV. The percentage of EV infection was determined separately by intracellular staining of the VP1 protein of EV with a specific monoclonal antibody (anti-enterovirus, clone 5-D8/1, Dako) followed by a staining with a DyLight[™]488-conjugated goat anti-mouse IgG (BioLegend).

Na₂⁵¹CrO₄ cytotoxic assay

Tumor cell lines were incubated with Na₂⁵¹CrO₄ (PerkinElmer) for 1 h at 37°C. 10^3 tumor cells (target) were then washed and co-cultured with NY67-specific CD4+ T cell clone (effector) in a 96-well plate for 4 h at 37°C in quadruplicate. Effector:target (E:T) ratio was 10:1. After a 4 h incubation at 37°C, 25 μ l of each supernatant were collected and added to 100 μ l scintillation liquid cocktail (OptiPhase "Supermix", PerkinElmer) before liquid scintillation counting. The percentage of specific lysis was calculated as follows: (experimental release – spontaneous release)/(maximum release – spontaneous release) x 100. The spontaneous release of ⁵¹Cr was determined from target cells cultured alone. The maximum release of ⁵¹Cr was obtained from target cells which were lyzed in media containing 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich).

Western blotting

M18 tumor cells were infected by MV and lyzed by freeze/thaw cycles in medium with 0.1% FCS. Supernatant of NI, MV and FT conditions were collected and cells from NI condition were lyzed in a RIPA buffer containing Protease Inhibitor Cocktail (Sigma). The samples were sonicated for 3 cycles of 10 seconds and supernatant samples were concentrated on filter (Vivaspin turbo 4, 3000 MWCO, Sartorius). After denaturation at 95°C for 5 min in Laemmli buffer with 10% beta-mercaptoethanol,

20 μg of proteins for cellular lysate or 50 μg for supernatants were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis on 10% gels and transferred to PVDF membranes. Blots were incubated with NY-ESO-1 or actin primary antibodies (cell signaling), followed by incubation with HRP-coupled secondary antibodies. Proteins were revealed using Enhanced Chemiluminescence Detection ECL (BioRad).

Disclosure statement

FT, MG and JFF are authors of patents on MV. YW is author of a patent on adenovirus. The other authors do not have conflict of interest.

Acknowledgments

We thank Philippe Hulin and the cellular and tissular core facility of Nantes University (MicroPiCell) for their expertise in video microscopy. We thank Juliette Desfrancois and the core facility of flow cytometry (Cytocell).

Funding

This work was supported by “La Ligue Régionale Grand Ouest contre le Cancer” (CSIRGO: CD16, CD22, CD44, CD49, CD72, CD79 and CD85), “La Ligue Nationale contre le Cancer”, “l’association ARSMESO44”, “La Fondation du Souffle et le Fonds de Dotation Recherche en Santé Respiratoire”, “La fondation ARC”, “la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM)”, Agence Nationale pour la Recherche (ANR-16-CE18-0016) and LabEX IGO program supported by the National Research Agency via the investment of the future program ANR-11-LABX-0016-01”. JCB is supported by the Canadian Cancer Society, the Terry Fox Foundation and the Ontario Institute for Cancer research.

References

- Russell SJ, Peng KW, Bell JC. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol.* 2012;30(7):658–70. doi:10.1038/nbt.2287.
- Lichty BD, Breitbach CJ, Stojdl DF, Bell JC. Going viral with cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(8):559–67. doi:10.1038/nrc3770.
- Bartlett DL, Liu Z, Sathaiiah M, Ravindranathan R, Guo Z, He Y, Guo ZS. Oncolytic viruses as therapeutic cancer vaccines. *Mol Cancer.* 2013;12(1):103. doi:10.1186/1476-4598-12-103.
- Workenhe ST, Mossman KL. Oncolytic virotherapy and immunogenic cancer cell death: sharpening the sword for improved cancer treatment strategies. *Mol Ther.* 2014; 22(2):251–6. doi:10.1038/mt.2013.220.
- Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P, Boon T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(2):135–46. doi:10.1038/nrc3670.
- Wang RF, Wang HY. Immune targets and neoantigens for cancer immunotherapy and precision medicine. *Cell research.* 2017;27(1):11–37. doi:10.1038/cr.2016.155.
- Jager E, Chen YT, Drijfhout JW, Karbach J, Ringhoffer M, Jager D, Arand M, Wada H, Noguchi Y, Stockert E, et al. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J Exp Med.* 1998;187(2):265–70. doi:10.1084/jem.187.2.265.
- Hunder NN, Wallen H, Cao J, Hendricks DW, Reilly JZ, Rodmyre R, Jungbluth A, Gnjatich S, Thompson JA, Yee C, et al. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N Engl J Med.* 2008;358(25):2698–703. doi:10.1056/NEJMoa0800251.
- Rapoport AP, Stadtmauer EA, Binder-Scholl GK, Goloubeva O, Vogl DT, Lacey SF, Badros AZ, Garfall A, Weiss B, Finklestein J, et al. NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nat Med.* 2015;21(8):914–21. doi:10.1038/nm.3910.
- Robbins PF, Kassim SH, Tran TL, Crystal JS, Morgan RA, Feldman SA, Yang JC, Dudley ME, Wunderlich JR, Sherry RM, et al. A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: long-term follow-up and correlates with response. *Clin Cancer Res.* 2015;21(5):1019–27. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2708.
- Fonteneau JF, Brilot F, Munz C, Gannage M. The Tumor Antigen NY-ESO-1 Mediates Direct Recognition of Melanoma Cells by CD4+ T Cells after Intercellular Antigen Transfer. *J Immunol.* 2016;196(1):64–71. doi:10.4049/jimmunol.1402664.
- Munz C. Autophagy proteins in antigen processing for presentation on MHC molecules. *Immunological reviews.* 2016;272(1):17–27. doi:10.1111/imr.12422.
- Foloppe J, Kintz J, Futin N, Findeli A, Cordier P, Schlesinger Y, Hoffmann C, Tosch C, Balloul JM, Erbs P. Targeted delivery of a suicide gene to human colorectal tumors by a conditionally replicating vaccinia virus. *Gene Ther.* 2008;15(20):1361–71. doi:10.1038/gt.2008.82.
- Stojdl DF, Lichty BD, tenOever BR, Paterson JM, Power AT, Knowles S, Marius R, Reynard J, Poliquin L, Atkins H, et al. VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer cell.* 2003;4(4):263–75. doi:10.1016/S1535-6108(03)00241-1.
- Le Boeuf F, Diallo JS, McCart JA, Thorne S, Falls T, Stanford M, Kanji F, Auer R, Brown CW, Lichty BD, et al. Synergistic interaction between oncolytic viruses augments tumor killing. *Mol Ther.* 2010;18(5):888–95. doi:10.1038/mt.2010.44.
- Kambara H, Okano H, Chiocca EA, Saeki Y. An oncolytic HSV-1 mutant expressing ICP34.5 under control of a nestin promoter increases survival of animals even when symptomatic from a brain tumor. *Cancer Res.* 2005;65(7):2832–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3227.
- Venskus D, Kalvins I, Pjanova D, Petrovska R, Auzins J. Genetically stable oncolytic RNA virus, method of manufacturing and use thereof. European patent EP2826856. 2013 July 16.
- Coffin RS. From virotherapy to oncolytic immunotherapy: Where are we now? *Curr Opin Virol.* 2015;13:93–100. doi:10.1016/j.coviro.2015.06.005.
- Fonteneau JF, Achard C, Zaupa C, Foloppe J, Erbs P. Oncolytic immunotherapy: The new clinical outbreak. *Oncoimmunology.* 2015;5(1):e1066961. doi:10.1080/2162402X.2015.1066961.
- Achard C, Boisgerault N, Delaunay T, Tangy F, Grégoire M, Fonteneau JF. Induction of immunogenic tumor cell death by attenuated oncolytic measles virus. *J Clin Cell Immunol.* 2015;6:291.
- Donnelly OG, Errington-Mais F, Steele L, Hadac E, Jennings V, Scott K, Peach H, Phillips RM, Bond J, Pandha H, et al. Measles virus causes immunogenic cell death in human melanoma. *Gene Ther.* 2013 Jan;20(1):7–15. doi:10.1038/gt.2011.205.
- Gauvrit A, Brandler S, Sapède-Peroc C, Boisgerault N, Tangy F, Grégoire M. Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response. *Cancer Res.* 2008;68(12):4882–92. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6265.
- Guillerme JB, Boisgerault N, Roulois D, Menager J, Combredet C, Tangy F, Fonteneau JF, Grégoire M. Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Clin Cancer Res.* 2013;19(5):1147–58. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2733.
- Galanis E, Atherton PJ, Maurer MJ, Knutson KL, Dowdy SC, Cliby WA, Haluska P Jr, Long HJ, Oberg A, Aderca I, et al. Oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter to treat drug-resistant ovarian cancer. *Cancer Res.* 2015;75(1):22–30. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2533.
- Heo J, Reid T, Ruo L, Breitbach CJ, Rose S, Bloomston M, Cho M, Lim HY, Chung HC, Kim CW, et al. Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer. *Nat Med.* 2013;19(3):329–36. doi:10.1038/nm.3089.

26. Andtbacka RH, Ross M, Puzanov I, Milhem M, Collichio F, Delman KA, Amatruda T, Zager JS, Cranmer L, Hsueh E, et al. Patterns of Clinical Response with Talimogene Laherparepvec (T-VEC) in Patients with Melanoma Treated in the OPTiM Phase III Clinical Trial. *Annals of surgical oncology*. 2016;23(13):4169–77. doi:10.1245/s10434-016-5286-0.
27. Vaughan HA, Svobodova S, Macgregor D, Sturrock S, Jungbluth AA, Browning J, Davis ID, Parente P, Chen YT, Stockert E, et al. Immunohistochemical and molecular analysis of human melanomas for expression of the human cancer-testis antigens NY-ESO-1 and LAGE-1. *Clin Cancer Res*. 2004;10(24):8396–404. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0809.
28. Puzanov I, Milhem MM, Minor D, Hamid O, Li A, Chen L, Chastain M, Gorski KS, Anderson A, Chou J, et al. Talimogene Laherparepvec in Combination With Ipilimumab in Previously Untreated, Unresectable Stage IIIB-IV Melanoma. *J Clin Oncol*. 2016;34(22):2619–26. doi:10.1200/JCO.2016.67.1529.
29. Fonteneau JF, Larsson M, Somersan S, Sanders C, Munz C, Kwok WW, Bhardwaj N, Jotereau F. Generation of high quantities of viral and tumor-specific human CD4+ and CD8+ T-cell clones using peptide pulsed mature dendritic cells. *Journal of immunological methods*. 2001;258(1-2):111–26. doi:10.1016/S0022-1759(01)00477-X.
30. Davodeau F, Difilippantonio M, Roldan E, Malissen M, Casanova JL, Couedel C, Morcet JF, Merckenschlager M, Nussenzweig A, Bonneville M, et al. The tight interallelic positional coincidence that distinguishes T-cell receptor α usage does not result from homologous chromosomal pairing during α rearrangement. *EMBO J*. 2001;20(17):4717–29. doi:10.1093/emboj/20.17.4717.
31. Arden B, Clark SP, Kabelitz D, Mak TW. Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics*. 1995;42(6):455–500.
32. Combredet C, Labrousse V, Mollet L, Lorin C, Delebecque F, Hurtrel B, McClure H, Feinberg MB, Brahic M, Tangy F. A molecularly cloned Schwarz strain of measles virus vaccine induces strong immune responses in macaques and transgenic mice. *J Virol*. 2003;77(21):11546–54. doi:10.1128/JVI.77.21.11546-11554.2003.
33. Diallo JS, Le Boeuf F, Lai F, Cox J, Vaha-Koskela M, Abdelbary H, MacTavish H, Waite K, Falls T, Wang J, et al. A high-throughput pharmacoviral approach identifies novel oncolytic virus sensitizers. *Mol Ther*. 2010;18(6):1123–9. doi:10.1038/mt.2010.67.
34. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*. 2012;9(7):676–82. doi:10.1038/nmeth.2019.

DISCUSSIONS

L'immunothérapie oncolytique exploite les propriétés lytiques et immunogènes des virus oncolytiques (OV). Ces virus non pathogènes répliquatifs ciblent sélectivement les cellules tumorales sans nuire aux tissus sains. Cette stratégie novatrice a pour conséquence de briser la tolérance établie dans le microenvironnement du cancer et de stimuler l'immunité antitumorale ¹¹⁸. Le tropisme tumoral préférentiel des OV est dû à des défauts tels que la perte des interférons de type I (IFN I) acquise par les cellules cancéreuses au cours de leur évolution. Lors de ma thèse, j'ai étudié plusieurs aspects de cette stratégie thérapeutique.

J'ai tout d'abord identifié le défaut de la réponse IFN I le plus fréquent dans le Mésothéliome Pleural Malin (MPM) comme étant la délétion homozygote des gènes codant pour les IFN- α et IFN- β (Figure 18 projet n°1). Ces délétions rendent les cellules tumorales permissives au virus de la rougeole (MV) et sont fréquentes dans d'autres cancers comme le gliome. Étonnamment, le lien entre les délétions des gènes IFN I et la sensibilité des cellules tumorales aux OV n'a jamais été fait à notre connaissance, nous sommes donc les premiers à l'établir dans le MPM.

Au cours de ma thèse, j'ai aussi démontré que le VVTK-RR- (VV : Virus de la Vaccine, TK : Thymidine Kinase, RR : Ribonucléotide Réductase) présente une activité oncolytique *in vitro* importante et rapide contre le MPM et améliore la survie de souris immunodéficientes dans un modèle de xénogreffe de tumeur humaine (Figure 18 projet n°2). La société Transgene pourrait être intéressée de développer un essai clinique basé sur ce virus pour le traitement du MPM.

Enfin, j'ai démontré un nouveau mécanisme de stimulation de la réponse immunitaire antitumorale humaine par les OV. En effet, j'ai pu établir que les cellules tumorales de mélanome lysées par différents OV libèrent des antigènes de tumeur, tels que NY-ESO-1, qui peuvent ensuite être re-capturés par les cellules tumorales voisines et présentés par les molécules HLA de classe II à des lymphocytes T (LT) CD4+ cytotoxiques (Figure 18 projet n°3). Ces résultats démontrent que les OV peuvent aussi favoriser la réponse immunitaire antitumorale au niveau de sa phase effectrice.

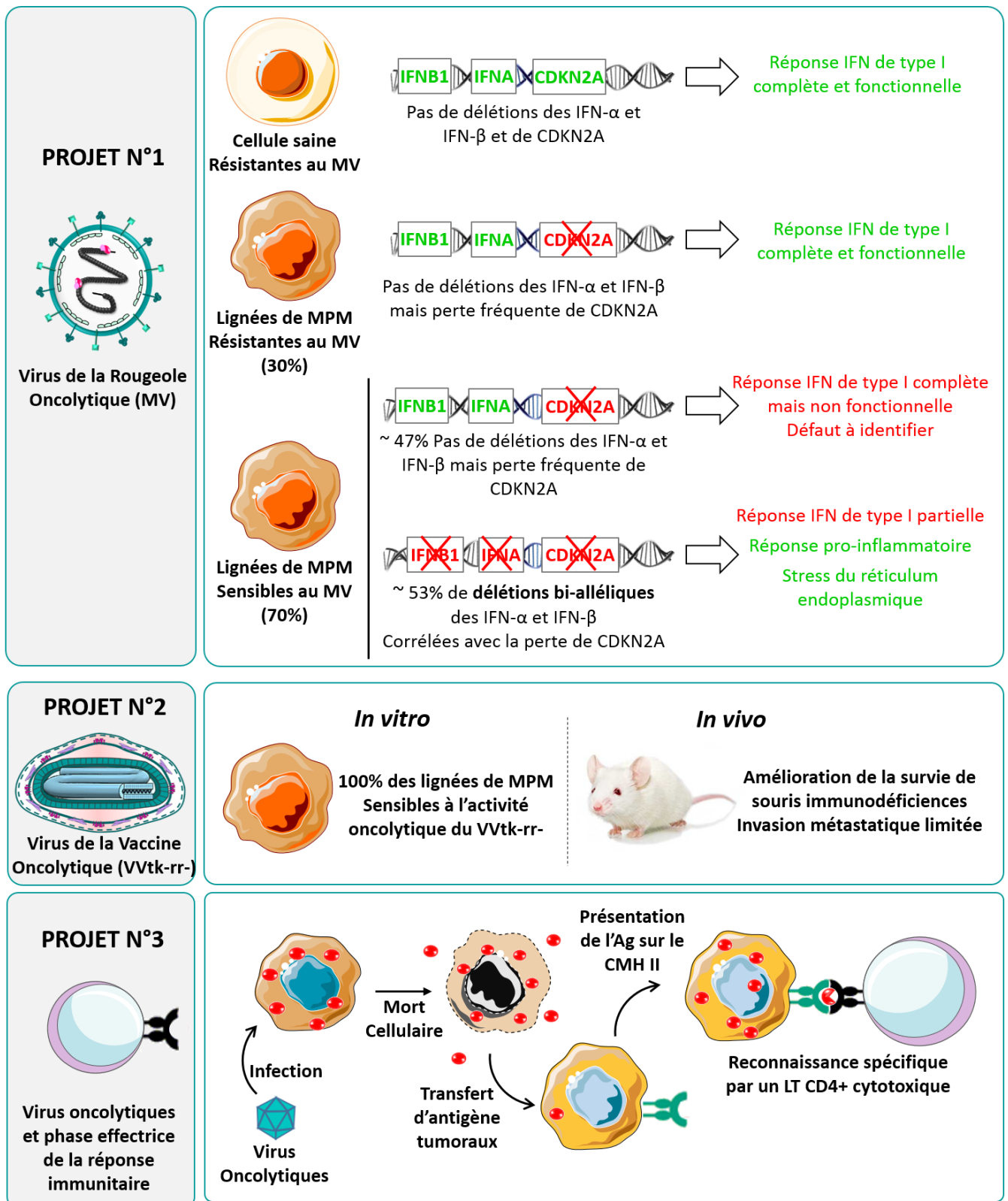


Figure 18. Récapitulatifs des principaux résultats obtenus dans les 3 projets menés au cours de cette thèse.

✓ Identification des défauts de réponse IFN de type I et de leurs conséquences dans le mésothéliome pleural malin.

Le MPM est un cancer agressif⁵⁶ qui présente un besoin urgent de nouvelles stratégies thérapeutiques. Notre équipe, dirigée par le Dr. M Grégoire, évalue les propriétés oncolytiques et immunostimulatrices de la souche vaccinale Schwarz du virus de la rougeole (MV) pour le traitement du MPM. Les souches atténuées du MV sont naturellement oncolytiques contre de nombreux types de cellules tumorales^{150,860}. Contrairement à la souche sauvage, le récepteur d'entrée majeur des souches vaccinales est la molécule CD46, dont l'expression est ubiquitaire. Néanmoins, CD46 est surexprimé en surface des cellules cancéreuses pour échapper à la cytotoxicité médiée par le complément^{231,253,254}. Récemment, le Dr. Carole Achard, une ancienne doctorante de notre équipe, a montré que 15 lignées de MPM sur les 22 testées sont sensibles à la réplication du MV et à son effet cytopathique (70%)²⁵⁶. A l'inverse, 4 types de cellules saines (cellules mésothéliales péritonéales, cellules épithéliales bronchiques, fibroblastes pulmonaires et cellules endothéliales pulmonaires) et les 7 lignées de MPM restantes ne sont pas ou très peu permissives à sa réplication. Contrairement à ce qui était décrit dans la littérature, aucune corrélation de sensibilité du MPM au MV avec le niveau d'expression de CD46 à leur surface n'a été trouvée. Toutes les cellules qui expriment CD46 sont susceptibles à l'infection. Nous avons ensuite mis en évidence que la permissivité au MV dans les lignées de MPM sensibles est dépendante d'une réponse IFN I déficiente. De plus, l'ajout d'IFN I sur les 11 lignées sensibles sur 15 qui ne produisent pas d'IFN- α et d'IFN- β , inhibe la réplication virale ce qui suggérerait que ces défauts sont situés en amont du récepteur IFNAR.

Dans la première étude qui s'inscrit dans la continuité des travaux du Dr. Carole Achard, j'ai voulu identifier les défauts de réponse IFN I présents dans les lignées de MPM sensibles au MV et comprendre les conséquences de ces défauts dans le cadre de l'immunothérapie oncolytique.

J'ai d'abord confirmé les résultats du Dr. Carole Achard en démontrant que seule la voie IFN I régit la sensibilité des lignées de MPM à l'activité oncolytique du MV. En effet, elle avait précédemment montré que les lignées sensibles préalablement traitées par de l'IFN I puis infectées par le MV sont capables de contrôler la progression du virus²⁵⁶. Nous avons

montré par une expérience complémentaire qu'un traitement avant infection des cellules saines ou des lignées de MPM résistantes par un inhibiteur de la signalisation IFNAR, le ruxolitinib, permet une réplication du MV efficace. De plus, en présence de ruxolitinib, le MV n'est plus capable d'induire l'expression des ISG (Interferon Stimulated-Genes) chez les cellules saines et les lignées résistantes.

Nous avons ensuite identifié la délétion bi-allélique des gènes qui codent pour les cytokines IFN I (IFN- α et β) comme étant le défaut majeur responsable de la sensibilité des cellules de MPM humaines à l'activité oncolytique du MV. En effet, 8 lignées sur 15 sensibles au virus ont perdu les deux copies de ces gènes, soit 36% des lignées de MPM de notre laboratoire.

D'autre part, nous avons évalué la perte du gène suppresseur de tumeur *CDKN2A* situé dans le même locus p21.3 du chromosome 9 et qui est l'altération la plus fréquente dans le mésothéliome avec 60 à 80% des MPM présentant ces délétions^{29,32,33}. Nous avons montré une perte des deux copies du gène *CDKN2A* chez toutes les lignées de notre biocollection à l'exception de la lignée Meso 61, soit une fréquence de délétion de 95%, supérieure à la fréquence décrite dans la littérature. Nous avons donc sollicité le Dr. D Jean (Laboratoire de Génomique Fonctionnelle des tumeurs solides Inserm U1162, Paris) qui possède une biocollection composée de 80 lignées cellulaires de MPM à faible nombre de passages afin qu'il détermine la fréquence de délétion bi-allélique des gènes *IFNB1* et *CDKN2A*. 71% et 23% de ces lignées cellulaires ont perdu les deux copies des gènes *CDKN2A* et *IFNB1*, respectivement. La différence de pourcentage observée entre la biocollection de notre laboratoire et celle du Dr. D Jean peut s'expliquer par des différences du nombre de passages en culture. En effet, la majorité de nos lignées de MPM ont un nombre de passages élevé (>10) provoquant probablement un biais de culture avec des lignées de MPM *CDKN2A*^{-/-} plus faciles à établir sur le long terme. Par ailleurs, le nombre d'échantillons dans la biocollection du Dr. D Jean étant plus important, les pourcentages obtenus reflètent sûrement mieux la réalité.

De manière intéressante, nous avons établi une plus forte fréquence de délétion bi-allélique du gène *IFNB1* chez les lignées cellulaires avec une composante sarcomatoïde. Ces formes de MPM sont plus agressives et répondent moins aux traitements recommandés. Dans la biocollection du Dr. D Jean, 47% des sous-types de MPM biphasique, sarcomatoïde et desmoplastique présentaient cette délétion. Cela joue peut-être un rôle dans leur agressivité puisque les altérations de la voie IFN I dans les tumeurs participent à l'échappement

immunitaire. Ce résultat suggère que l'immunothérapie oncolytique serait une bonne approche thérapeutique pour ces formes plus agressives de MPM.

J'ai aussi analysé la base de données publiques The Cancer Genome Atlas (TCGA) sur le site Cbioportal.org pour déterminer la fréquence des délétions bi-alléliques étudiées dans le MPM, mais aussi dans les autres cancers. Ainsi, un séquençage à haut débit réalisé sur des biopsies de tumeur de 87 patients atteints de MPM a permis d'identifier des délétions bi-alléliques à une fréquence de 43,8% pour *CDKN2A*, 18,4% pour *IFNA2* et 9,2% *IFNB1*. Ces pourcentages, celui de *CDKN2A* notamment, sont bien inférieurs aux résultats du Dr. Didier Jean. Cependant, la présence de cellules saines infiltrant la tumeur masque probablement la présence de délétions bi-alléliques dans les cellules cancéreuses, pouvant ainsi expliquer la sous-estimation de la fréquence obtenue dans le TCGA comparé aux résultats précédents. Par ailleurs, il a été décrit que certaines tumeurs sont hétérogènes avec des cellules tumorales ayant les délétions et d'autres portant des gènes non altérés ⁸⁶¹.

De même, J'ai analysé dans le TCGA et de manière non exhaustive les altérations d'autres protéines impliquées dans la voie IFN I chez les 87 patients atteints de MPM. Deux patients porteurs de délétions bi-alléliques *IFNB1* et *CDKN2A* ont une altération au niveau des senseurs cytoplasmiques avec soit une délétion de *DDX58* (RIG-I) soit une mutation d'*IFIH1* (MDA-5). D'autre part, 5 patients avec un gène *IFNB1* fonctionnel sont porteurs soit d'une amplification de *JAK1* ou de *JAK2*, soit d'une fusion de *STAT1* ou soit d'une mutation de *STAT1* ou *STAT2*. Une étude plus poussée serait cependant nécessaire pour déterminer si la fusion et les mutations observées sont délétères pour la signalisation IFNAR. Ainsi, certaines de ces altérations pourraient peut-être expliquer les défauts observés dans les 7 autres lignées de MPM sensibles au MV qui ont toujours les gènes codant les IFN I.

Dans la littérature, les défauts de la voie IFN I dans le mésothéliome sont mal décrits. Plusieurs publications ont démontré des délétions dans la région p21 à p22 du chromosome 9 portant les gènes des IFN I, mais à l'époque, l'intérêt de ces études portait principalement sur la délétion des gènes suppresseurs de tumeur *CDKN2A* et *CDKN2B* codant pour les protéines p16^{INK4a} (et p14^{arf}) et p15, respectivement, également situés sur cette région. L'équipe du Dr. J Testa en 1993 a notamment montré la perte des régions 9p21-p22 pour 83% des lignées cellulaires de MPM (sur 23 lignées cellulaires) et décrit une délétion homozygote du cluster de gènes des IFN I dans 26% des lignées cellulaires ⁸⁶². A notre connaissance, aucune

étude ne relate explicitement la perte des gènes des IFN dans le MPM. Ainsi, cette étude met en lumière le potentiel thérapeutique d'une perte des gènes des IFN I pour le traitement du MPM, et notamment des sous-types sarcomatoïdes les plus agressifs, par l'immunothérapie oncolytique utilisant des virus sensibles à l'IFN I tels que le MV.

Au regard de ces résultats, une question intéressante est de savoir si la perte des gènes des IFN I est une simple conséquence de la perte du gène voisin *CDKN2A* ou si la cellule tumorale en tire vraiment un avantage. La lignée MPM_51 nous permet d'apporter un élément de réponse. En effet, cette lignée a perdu le gène *IFNB1* mais pas *CDKN2A* démontrant ainsi que les cellules tumorales peuvent perdre les gènes des IFN I sans perdre *CDKN2A*. Ce résultat qu'il faudrait cependant confirmer chez d'autres patients suggère tout de même qu'il ne s'agit pas seulement d'un dommage collatéral et que des variants tumoraux n'ayant perdu que les gènes des IFN I et pas *CDKN2A* peuvent être sélectionnés dans la tumeur.

D'autre part, il est possible que la perte des gènes des IFN- α et β dans le mésothéliome soit les conséquences d'une sélection en raison d'une activation de cette voie lors du développement du cancer. Il est en effet largement admis que la réponse IFN I freine la progression tumorale de par ses fonctions anti-prolifératives, anti-angiogéniques et pro-apoptotiques ⁸³³. Concernant le MPM, notre première hypothèse est que cette activation serait due à la perturbation par les fibres d'amiante du cytosquelette des cellules sans les tuer. Ce phénomène provoquerait l'induction de la voie STING conduisant à l'activation de la réponse IFN I. Plusieurs études démontrent cet effet lors de la fusion de membranes virales avec les membranes cellulaires. En 2012, Dr. Holm et ses collègues ont montré que des particules pseudo-virales (VLP) dépourvues de capsid et de matériel génomique, induisaient une réponse IFN I dans les cellules primaires murines et humaines indépendamment des TLR et de RIG-I mais impliquaient les molécules de signalisation STING et IRF3 ⁸⁶³. Les fibres d'amiante pourraient induire des perturbations semblables à celles provoquées par les VLP dans leur étude. La deuxième hypothèse a été établie à partir d'une étude menée par l'équipe du Dr. Barber qui indique que l'ADN endommagé des cellules tumorales peut déclencher l'activité intrinsèque de STING, en fuyant le noyau ou par d'autres mécanismes qui restent à clarifier ⁸⁶⁴⁻⁸⁶⁶. Vraisemblablement, cet événement augmenterait la production de cytokines dont les IFN I qui attireraient le système immunitaire vers les cellules endommagées. Ainsi, les fibres d'amiante pourraient percer le noyau de certaines cellules, provoquer des dommages

cellulaires conduisant à la libération cytoplasmique de l'ADN double brin. Enfin, la troisième possibilité est une réactivation dans les cellules tumorales des rétrovirus endogènes humains intégrés dans le génome qui induiraient une réponse anti-virale IFN I ⁸⁶⁷. La perte des signalisations STING et IFN I apporterait par conséquent un avantage sélectif qui favoriserait le développement de la tumeur.

Suite à ces données obtenues sur le MPM dans le TCGA, j'ai aussi évalué la perte des gènes *CDKN2A*, *IFNB1* et *IFNA2* dans une large gamme de cancers. Le glioblastome multiforme est le cancer qui présente la plus forte fréquence de délétions des gènes *IFNB1* et *IFNA1* (16,4% et 25,7%) suivi du mésothéliome (9,2% et 18,4%), et du cancer du pancréas (8,8% et 15,2%). Contrairement au MPM, la délétion des gènes codant les IFN I dans le GBM et le pancréas a été clairement établie dans les années 90 avec une fréquence d'environ 30% (13 sur 43 tissus tumoraux de GBM issus de patients) ⁸⁶⁸ et 50% (4 sur 8 lignées tumorales du cancer du pancréas) ⁸⁶⁹, respectivement. Là encore, les résultats TCGA et ceux issus de tissus tumoraux de GBM sont probablement sous-estimés en raison de contaminations cellulaires saines dans les échantillons analysés et de la technique employée. La perte fréquente des gènes des IFN I dans le GBM participe probablement à la sensibilité de ce cancer à l'immunothérapie oncolytique. De nombreux virus oncolytiques tels que le virus de l'herpès simplex de type 1 et l'adénovirus sont d'ailleurs particulièrement étudiés dans le traitement du GBM ⁸⁷⁰.

Le mélanome et le carcinome épidermoïde pulmonaire font également partie des cancers avec une fréquence élevée des délétions homozygotes *IFNB1* et *IFNA2*. Dans des études précédentes, notre équipe a démontré *in vitro* et *in vivo* la sensibilité de ces cancers à l'activité oncolytique du MV ^{149,340}. Sur les 13 lignées de mélanome étudiées, 10 étaient permissives au virus ⁴⁸². J'ai donc testé la présence du gène *IFNB1* dans ces lignées par PCR génomique et une seule des lignées sensibles au MV est porteuse d'une délétion bi-allélique du gène *IFNB1* (données non présentées). Ces résultats étendent à d'autres cancers le potentiel des délétions homozygotes des gènes IFN I comme facteur prédictif de la sensibilité au virus MV.

En avril 2018, une analyse des profils TCGA du nombre de copies d'environ 11 000 patients dans 31 types de cancer a été réalisée afin d'identifier des voies biologiques communes impliquées dans la tumorigénèse ⁸⁷¹. Outre les altérations bien connues dans les

gènes suppresseurs de tumeurs (PTEN, TP53 etc.), il a été montré des délétions des groupes de gènes impliqués dans la réponse immunitaire innée codant pour les IFN I (loci 9p21) et les défensines (DEF) (loci 8p21-23) chez au moins 7% des patients et dans 19 types de cancer sur 31 analysés. Dans cette étude, les patients portant des délétions homozygotes des IFN I et/ou des DEF avaient une plus faible survie globale et une survie sans maladie significativement réduite dans plusieurs types de cancer. De plus, une ré-analyse de données de séquençage d'exome (WES) de 109 patients atteints de mélanome métastatique traités par l'ipilimumab (thérapie anti-CTLA-4) suggérait une corrélation entre la résistance au traitement et la délétion homozygote des gènes des IFN I et DEF ⁸⁷¹.

Nos résultats ainsi que l'ensemble des études précédemment citées permettent de mieux comprendre l'importance des délétions des gènes des IFN I pour le traitement immunothérapeutique du mésothéliome mais aussi de nombreux autres cancers. Il est d'ailleurs étonnant de constater que le lien entre la sensibilité à un OV et la délétion des gènes des IFN I n'a pas déjà été établi dans les cancers où la délétion bi-allélique de *CDKN2A* est fréquente. A notre connaissance, nous sommes les premiers à établir ce lien grâce à la bio-collection de lignées de MPM que l'équipe du Dr. M Grégoire a établie. Ainsi, nos résultats suggèrent que la détection d'une perte bi-allélique des gènes des IFN I avant traitement par immunothérapie oncolytique pourrait potentiellement servir de marqueur prédictif de la réponse du patient et devrait donc être étudiée lors des essais cliniques en cours.

Dans cet optique, l'équipe du Dr. E Galanis a mis au point très récemment un algorithme de prédiction basé sur l'analyse de l'activation constitutive de la voie IFN I pour adapter un traitement oncolytique ou des stratégies combinatoires chez des patients atteints de glioblastome multiforme ou de cancer de l'ovaire ⁸⁷². Dans un premier temps, ils ont montré par une étude préclinique *in vivo* et *in vitro* que les lignées de GBM sont résistantes à la réplication du MV en raison d'une réponse IFN I basale constitutivement active et que les lignées permissives à la réplication du MV avaient un état antiviral basal éteint. De plus, ils ont démontré que l'utilisation de l'inhibiteur de la signalisation IFNAR, le ruxolitinib, 48 heures avant infection des lignées résistantes au MV, réprimait l'expression des ISG et augmentait considérablement la réplication virale. Ensuite, un algorithme de prédiction basé sur la signature de 22 ISG (gènes stimulés par les IFN, Interferon-Stimulated Genes) a permis de classer des lignées primaires de GBM et de cancer de l'ovaire dérivées de patients en lignées répondeuses/non répondeuses au MV. Après implantation chez des souris NOD-SCID, le

traitement par le MV a montré une différence de survie médiane de 15 jours pour le GBM et 22 jours pour le cancer de l'ovaire par rapport au MV inactivé chez une des lignées classées répondeuses. A l'inverse, la lignée classée non répondeuse ne bénéficie pas d'une amélioration de survie avec le MV. Alors testé en modèle préclinique, cet algorithme de prédiction a été appliqué chez 10 patients atteints de GBM traités par le MV dans un essai clinique de phase I en cours (NCT00390299). L'algorithme a identifié les patients supposés répondre le mieux au traitement, car les ISG sont faiblement exprimés dans leur tumeur. De plus chez ces patients, la réplication du MV a été mise en évidence.⁸⁷².

Grâce à une analyse transcriptomique et par western blot, nous avons nous aussi démontré que les lignées de MPM résistantes au MV présentent un niveau basal des ARN messagers d'ISG et des protéines codées par les ISG constitutivement élevés. A l'inverse, les 8 lignées de MPM sensibles au MV avec une délétion bi-allélique des gènes des IFN I avaient une expression basale nulle ou très faible des ISG. Dans l'étude du Dr. E Galanis, il serait donc intéressant de comparer le résultat obtenu par l'algorithme et une analyse des délétions bi-alléliques des gènes des IFN I chez les patients⁸⁷².

Lors de l'infection par le MV ou d'un traitement par de l'IFN- α et β , les cellules saines et les lignées de MPM résistantes à la réplication virale sur-expriment fortement un grand nombre d'ISG nécessaires au contrôle de la progression virale. Les lignées sans les gènes des IFN I exposées au MV développent une réponse IFN I partielle et faible, caractérisée par l'expression d'un nombre limité d'ISG. Ainsi, notre étude a permis une classification des ISG en deux groupes ; les ISG induits par le MV en absence des IFN I (ISG NSD : ISG non strictement dépendant des IFN I dont *RSAD2*, *IFIT1*, *OAS1* et *DDX58*) et les ISG qui nécessitent absolument la présence des IFN I pour être exprimés (ISG SD : ISG strictement dépendant des IFN I dont *XAF1*, *TLR3*, *STAT1* et *Mx1*). En outre, les lignées sensibles expriment les mêmes ISG que les lignées résistantes lorsqu'elles sont traitées directement par de l'IFN- α et β , confirmant bien que la perte des IFN I est le défaut principal chez ces lignées et que la signalisation IFNAR est toujours fonctionnelle.

D'après nos résultats, l'algorithme de prédiction établi par l'équipe du Dr. E Galanis basé sur l'expression basale de 22 ISG⁸⁷² pourrait être appliqué au MPM afin de prédire la réponse des patients au traitement. Néanmoins, il est intéressant de noter que la moitié des 22 ISG de cet algorithme ont été classés dans notre étude dans le groupe des ISG NSD (*OAS*,

IFIT, IFIH). Il pourrait être intéressant que nos données transcriptomiques soient analysées par cet algorithme et de voir comment nos lignées sont classées (sensibles ou non).

La classification des ISG en 2 groupes distincts a déjà été évoquée dans de nombreux travaux. Bien que certaines études démontrent l'implication des IFN de type III dans l'expression de certains ISG, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'expression d'ISG NSD après un traitement par de l'IL-29 (*IFNL1*) des lignées sensibles. D'autre part, la présence d'un inhibiteur des IFN I et III, le ruxolitinib, ne diminue pas l'expression des ISG NSD induite par le MV chez ces lignées. Le facteur de transcription IRF3 a largement été reconnu comme capable d'induire directement l'expression d'ISG précocement afin de bloquer au plus vite la progression virale. En effet, des expériences de délétion (KO) et d'expression ectopique d'IRF3 ont démontré l'induction directe des ISG *CXCL10*, *GBP*, *ISG15* et *IFIT-2* par IRF3⁸²⁵. A l'inverse, l'expression des ISG *OAS*, *PKR* et *IRF7* est strictement dépendante du complexe ISGFR3 et donc des IFN I lors d'une infection par le virus Newcastle Disease. Nos résultats transcriptomiques concordent avec ces travaux exceptés pour la famille *OAS*. Il n'est cependant pas surprenant que certains ISG diffèrent en fonction du virus et du type de cellules étudiées. Nous avons également confirmé les résultats obtenus par l'équipe du Dr. K Mossman en 2001 qui a utilisé un mutant d'IRF3 constitutivement actif en présence d'anticorps neutralisant contre l'IFN- α/β et a démontré par puces à ADN, l'expression des ISG *OAS*, *GBP*, *p44*, *ISG15*, *IFIT-2*, *IFIT-1* et *IFIT-3* parmi 8556 gènes étudiés⁸²⁷. Cette même équipe a aussi montré que la perturbation membranaire lors de la fusion virale entraîne une forte expression d'*ISG56* dépendante uniquement d'IRF3 et pas des IFN I⁸²⁸. D'autre part, il a aussi été mis en évidence que NF- κ B est impliqué dans l'expression d'ISG tel que les cytokines *CXCL10* et *CCL5*⁸⁷³. Au vu de ces nombreuses publications, il est très probable que la classe des ISG NSD mise en évidence soit induite directement par IRF3 ou par NF- κ B.

Notre étude apporte des éléments nouveaux à ces différents travaux. En effet, toutes ces expériences ont été réalisées sur des modèles cellulaires modifiés *in vitro* avec majoritairement des expressions ectopiques d'IRF3 dans une seule lignée cellulaire en présence d'inhibiteurs des IFN I et avec un nombre limité d'ISG analysés. Nous offrons ici une étude plus complète en raison du nombre de transcrits évalués (> 30 000), qui a permis l'identification de nouveaux ISG NSD tels que *CXCL11*, *Mx2*, *RIG-I* et *HERC5*. De plus, nous disposons aussi d'une puissance statistique supérieure à ce qui a été fait auparavant avec

l'utilisation de 8 lignées de MPM. Enfin, nous observons ces types d'ISG dans une situation où des cellules tumorales ont naturellement perdu les gènes des IFN I au cours de leur développement et n'ont pas été modifiées.

Dans l'étude du Dr. C Achard, nous avons vu que 15 lignées de MPM sont sensibles à la réplication du MV ²⁵⁶. Dans la présente étude, nous montrons que 8 lignées sur 15 comportent une délétion bi-allélique des IFN I qui les rendent sensibles au MV. Ainsi, des défauts de la voie IFN I restent à identifier pour les 7 autres lignées de MPM sensibles. Parmi les 7 lignées, 3 lignées n'expriment pas les transcrits des IFN- α et β ²⁵⁶ malgré la présence de leurs gènes. Pour ces lignées, nous pouvons émettre plusieurs hypothèses. Des modifications épigénétiques telles que la méthylation des promoteurs pourraient intervenir dans la mise sous silence des gènes des IFN I. Des défauts de phosphorylation, de relocalisation nucléaire ou de fixation des facteurs de transcription IRF3, IRF7 ou NF- κ B sur les promoteurs des gènes des IFN I pourraient aussi être impliqués ⁸⁷⁴⁻⁸⁷⁷.

Parmi les 15 lignées sensibles, 4 lignées avaient été caractérisées par Dr. C Achard comme des « exceptions », car elles présentent une réponse IFN I complète qui pourtant n'est pas suffisante pour stopper la progression du MV ²⁵⁶. Nous avons pensé dans un premier temps que ces 4 lignées avaient des altérations de la voie de signalisation IFNAR. En effet, dans la littérature, les défauts de la voie IFN I intervenant en aval du récepteur IFNAR dans le cancer ont souvent été décrits dont la perte de la protéine p48 (ou IRF9) ³¹³ ou l'altération des protéines JAK ou STAT ^{878,879}. Nous avons exclu cette hypothèse car ces 4 lignées expriment Mx1 en réponse à de l'IFN I (données non montrés), ce qui démontre que la signalisation IFNAR est fonctionnelle. Nous supposons donc que les ISG impliqués dans la restriction du MV sont soit manquants soit présentent des mutations altérant leurs fonctions antivirales.

D'après les résultats d Dr. C Achard, aucune des 22 lignées de MPM étudiées ne présente d'altération de la signalisation IFNAR. Ainsi, l'IFN I produit en réponse au virus par les cellules saines environnantes telles que les cellules dendritiques et mésothéliales saines peut par conséquent induire l'expression des ISG chez les cellules tumorales et réduire la propagation du virus. Il serait donc intéressant de réaliser des co-cultures de cellules saines et tumorales afin d'évaluer une potentielle limitation de l'activité oncolytique du virus. Ainsi, en cas d'un effet avéré, il serait intéressant de développer des techniques pour bloquer la signalisation IFNAR seulement dans les cellules tumorales.

A l'heure actuelle, aucun ISG n'a été identifié comme étant capable de réprimer plus de 50% de l'infection par le MV contrairement à de nombreux autres virus. En effet, l'étude menée par le Dr. Schoggins et ses collaborateurs sur plus de 350 ISG démontre une inhibition supérieure à 50% de la réplication de nombreux virus tels que virus Coxsackie B, poliovirus, le virus parainfluenza de type 3 par la protéine IRF1 ou du virus Newcastle Disease par MX1, tandis que la plupart des ISG sont incapables seuls d'inhiber le MV ⁷⁷³. Ceci suggère que les ISG doivent agir probablement de concert pour inhiber totalement la réplication du MV. Ainsi, une étude plus approfondie des 4 lignées exceptions pourrait probablement permettre d'identifier un ou plusieurs ISG absents ou mutés impliqués dans le contrôle du MV. Ainsi, leur identification pourrait permettre ensuite de les inactiver spécifiquement par la technique de CRISPR cas9 (CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) dans les lignées de MPM résistantes au MV ou de rétablir à l'inverse leur expression chez les 4 lignées de MPM « exceptions » afin de confirmer leur fonction.

Enfin, nous avons observé par une analyse des voies canoniques avec le logiciel Ingenuity que les lignées de MPM sensibles au MV qui ont perdu les gènes des IFN I développent également une réponse pro-inflammatoire. En effet, d'après cette analyse, plusieurs voies de signalisation de cytokines impliquées dans l'inflammation telles que TNF, IL-6 ou IL-17 sont induites par le virus. De plus, les voies associées au stress du réticulum endoplasmique et aux protéines mal-conformées, et la voie d'ubiquitination des protéines sont également activées.

Le Dr. MS Diamond et ses collègues ont obtenus des résultats très proches *in vivo* dans le contexte de la pathogenèse du virus du Nil occidental chez des souris dépourvues du gène du récepteur *Ifnar* dans les cellules myéloïdes. Les cellules *Ifnar* KO sont préférentiellement infectées et déclenchent une production de cytokines pro-inflammatoires incontrôlée telles que le TNF- α suite à l'activation de la voie NF- κ B ⁸⁷³. D'autre part, un lien étroit a été établi entre les réponses au stress du réticulum endoplasmique et l'induction d'une mort cellulaire immunogène ^{880,881}. Ainsi, la réponse pro-inflammatoire amplifiée et le stress de réticulum endoplasmique favorisent probablement la mort immunogène induite par le MV.

Notre équipe, dirigée par le Dr. M Grégoire, a été l'une des premières à étudier les virus oncolytiques du point de vue de l'immunité antitumorale ^{149,200,882,883}. Il a été démontré par notre équipe et d'autres groupes qu'une infection productive par le MV conduit à une

mort cellulaire immunogène (IDC : Immunogenic Cell Death) qui favorise la présentation croisée des antigènes tumoraux et initie la réponse T cytotoxique antitumorale. En effet, l'infection par le MV entraîne la translocation de la calréticuline à la membrane des cellules tumorales et le relargage de signaux de danger dans le milieu extracellulaire dont HMGB1, l'ATP, HSP70 et gp96, caractéristiques d'une mort immunogène. Notre équipe et le groupe du Dr. A Melcher ont évalué l'apparition de ces marqueurs de mort immunogène chez des cellules de mésothéliome et de mélanome ^{149,198} (données non publiées). Les effets cytopathiques et l'induction d'une ICD ont aussi été rapportés dans le carcinome épidermoïde par le virus de l'Herpès de type I (HSV) et dans l'adénocarcinome et le carcinome de l'endomètre lors de l'infection par un adénovirus (AdV) exprimant la protéine CD40L ^{195,197}.

Les virus étant fortement immunogènes, la libération de signaux de danger associée à la mort immunogène entraîne leur reconnaissance comme une entité étrangère. Une réponse innée immédiate contre le virus engendre une maturation des cellules présentatrices des antigènes (CPA : Cell Presenting Antigen), dont les cellules dendritiques (DC : Dendritic Cells), caractérisée par la production de cytokines comme les IFN I et l'augmentation du nombre de molécules de CMH de classe I et II à leur surface, favorable à la présentation antigénique. Ensemble, les événements immunologiques entraînés par les OV modulent l'environnement immunosuppresseur de la tumeur, le rendant plus propice à l'induction de l'immunité antitumorale.

Les travaux de l'équipe ont aussi permis de démontrer que les cellules de MPM infectées par le MV induisent la maturation de cellules dendritiques dérivées de monocytes (Mo-DC) caractérisée par l'expression de CD80, CD86, CD40 et CD83 et par la production de cytokines pro-inflammatoires. L'internalisation de fragments de cellules tumorales par les Mo-DC permet une présentation croisée de la mésothéline, un antigène de tumeur, et induit la prolifération *in vitro* de lymphocytes T CD8+ spécifiques de la mésothéline à partir de lymphocytes T naïfs ¹⁴⁹. Une expérience similaire a été réalisée plus tard par le Dr. JB Guillaume sur les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) qui sont des DC spécialisées dans la réponse immunitaire anti-virale¹⁵⁰. Il a mis en évidence la capacité des pDC à maturer suite à la reconnaissance de l'ARN simple brin du MV via le TLR7 par l'augmentation d'expression de marqueurs de maturation et de costimulation. De plus, les pDC produisent d'importantes quantités d'IFN- α en réponse au MV. Le Dr. JB Guillaume a aussi montré que les pDC cross-

présentent l'antigène de tumeur NY-ESO-1 à un clone de lymphocyte T CD8+ spécifique après internalisation de fragments de cellules de MPM infectées par le MV. Dans les deux études, la mort induite par le MV était immunogène puisque les cellules tumorales infectées induisaient fortement la maturation des Mo-DC et des pDC^{149,150}. Lorsque les cellules tumorales étaient tuées par irradiation UV-B qui induit une apoptose non-immunogène, elles n'étaient pas capables d'activer les Mo-DC et les pDC. Une autre équipe a montré que la souche MVA (Modified Virus Ankara) du virus de la vaccine induisait la maturation de DC immatures après phagocytose de fragments cellulaires de mélanome et facilitait la génération d'une réponse T spécifique de l'antigène de tumeur MelanA/MART-1⁴⁸³.

✓ Etude de l'activité oncolytique d'un virus de la vaccine modifié VVTK-RR- contre le mésothéliome pleural malin.

Le second projet de ma thèse était d'étudier l'activité oncolytique d'un virus de la vaccine modifié le VVTK-RR- contre le MPM *in vitro* et *in vivo*. L'immunothérapie oncolytique basée sur l'utilisation du virus de la vaccine est actuellement évaluée en clinique pour le traitement de plusieurs cancers et donne des résultats prometteurs¹³⁷.

Le JX-594 aussi appelé pexastimogene devacirepvec (PexaVec) est le virus de la vaccine (VV) le plus avancé cliniquement. Il code pour le GM-CSF et la β -galactosidase (β -gal) et a été inactivé pour le gène de la thymidine kinase (TK)²⁸⁸. Des essais cliniques évaluant le JX-594 seul ou en combinaison avec le sorafenib⁴¹², un inhibiteur de B-raf et du VEGFR, dans le traitement du mélanome⁶⁷⁹ et le carcinome hépatocellulaire⁶⁸⁰ ont montré des réponses tumorales objectives et une infiltration lymphocytaire périvasculaire intense. Une étude effet/dose de phase II du JX-594 chez des patients atteints d'hépatocarcinome avancé a montré un doublement de la survie médiane entre la dose de virus la plus faible (6,7 mois) et la plus forte (14,1 mois)²⁸⁵. Cette étude a conduit à une phase III où le JX-594 est administré en combinaison avec du sorafenib en comparaison de sorafenib administré seul (NCT02562755).

Le TG6002 est un OV créé par la société française de biotechnologie Transgene. Cette souche Copenhague du VV est délétée pour les gènes codant pour la TK et la ribonucléotide réductase (RR) assurant ainsi la spécificité tumorale. En effet, seules les cellules tumorales en

constante prolifération expriment la TK et la RR nécessaires à la réplication virale. Ce virus exprime aussi le gène suicide *FCU1*²⁸⁹ qui code pour une cytosine déaminase qui transforme la pro-drogue 5-FC en composé toxique 5-FU pour les cellules tumorales en division. Cette enzyme va donc être synthétisée en concentration plus élevée localement que lors d'une injection systémique et sera par conséquent plus efficace et moins toxique pour l'organisme. Le TG6002 associé au 5-FC est actuellement en essai clinique de phase I pour le traitement du glioblastome récurrent (NCT03294486).

Dans l'optique de développer un essai clinique pour traiter le MPM avec le TG6002, ce projet mené en collaboration avec le Dr. Joëlle Nader, une ancienne étudiante en thèse de l'équipe, portait donc sur l'étude de la sensibilité du MPM au VVTK-RR-. Ce virus est très proche de la souche TG6002 avec les deux délétions *TK* et *RR* mais exprime cependant la protéine GFP qui permet le suivi de la réplication virale à la place du gène suicide *FCU1*.

Sur les 22 lignées de MPM testées *in vitro*, toutes sont sensibles à la réplication du VV et à son effet cytopathique. Une première vague d'infection apparaît très rapidement avec des cellules GFP positives dès 6h, puis l'infection se propage aux cellules avoisinantes qui deviennent fluorescentes après 12H de contact avec le VV. La progression de ce virus est rapide et fulgurante comparée à ce que nous observons avec le MVeGFP qui présente deux vagues d'infection successives à 24 et 48h. En effet, le VV possède un cycle répliatif très court de par sa réplication qui se déroule dans le cytoplasme plutôt que dans le noyau contrairement à la plupart des virus à ADN. Ce cycle commence seulement quelques heures après son entrée dans la cellule hôte²⁶⁷. Par ailleurs, nous avons montré que le VV est capable de se répliquer et d'induire la mort des cellules de MPM qui aboutit à une nécrose secondaire *in vitro* caractérisée par l'éclatement des cellules tumorales qui libèrent alors la GFP dans l'environnement extracellulaire.

D'après ces résultats, la réponse antivirale IFN I présente chez certaines lignées de MPM n'est pas capable de bloquer la progression du VV comme nous l'avons précédemment montré avec le MV. La présence d'un attirail protéique complet et efficace codés par des gènes viraux pour stopper cette voie de signalisation tels que B18R et B8R qui inhibent les IFN I et N1L qui bloque les IRF3 et IRF7, permet d'apporter une explication évidente à l'échappement de cette souche aux réponses cellulaires antivirales^{855,856}.

Le Dr. Joëlle Nader a ensuite évalué *in vivo* l'activité oncolytique du VVTK-RR- chez des souris NOD SCID porteuses d'une tumeur de MPM humaine intrapéritonéale. Le traitement avec le VV a significativement augmenté la survie moyenne des animaux par rapport au groupe de souris témoin et a considérablement réduit l'invasion métastatique. Néanmoins, les souris traitées ont toutes été euthanasiées car leur tumeur échappait au traitement par le VVTK-RR-. Les sites primaires tumoraux ne semblaient pas avoir été contrôlés par le virus, il ne restait pas plus de trois tumeurs de taille importante au site d'injection par animal. Dans le contexte d'un système immunitaire adaptatif efficace, alors qu'il est déficient dans le modèle utilisé ici, l'efficacité du virus aurait peut-être été améliorée avec l'induction de lymphocytes T cytotoxiques pour développer une réponse immunitaire antitumorale ^{289,450}.

Avant de publier cette étude et de confirmer la déclaration d'intention de dépôt de brevet avec l'entreprise Transgene, elle va être complétée par deux expériences additionnelles. D'une part la toxicité du VVTK-RR- va être évaluée sur des cellules mésothéliales saines par titration du virus 48h après infection. D'autre part, Le TG6002 dans lequel le gène suicide *FCU1* a été inséré va être évalué dans le même modèle animal de xénogreffe d'une tumeur humaine. Ainsi, 4 groupes de souris seront constitués ; les souris qui recevront du PBS, celles qui recevront le 5-FC, celle qui recevront le TG6002 et celles qui recevront le TG6002 puis le 5-FC. Nous espérons que les souris traitées par la combinaison ne présenteront plus les quelques grosses tumeurs présentes chez les animaux traités seulement par le VVTK-RR-.

✓ **Etude des effets des virus oncolytiques sur la présentation de l'antigène de tumeur NY-ESO-1 par la voie HLA de classe II des cellules tumorales de mélanome.**

Dans le troisième projet de ma thèse, j'ai étudié l'effet de la lyse des cellules tumorales de mélanome sur leur capacité à présenter l'antigène de tumeur NY-ESO-1 par les molécules HLA de classe II.

Il est maintenant largement admis que la stratégie visant à utiliser les virus oncolytiques (OV) contre le cancer est basée sur l'oncolyse des cellules tumorales, mais aussi sur l'induction d'une réponse immunitaire antitumorale indispensable à son effet thérapeutique ^{482,884}. Les scientifiques les plus influents du domaine ont d'ailleurs renommé il

y a 2 ans le concept de virothérapie antitumorale en immunothérapie oncolytique pour mettre en avant l'effet immuno-stimulateur des OV.

Comme discuté précédemment, Les effets des OV sur les cellules présentatrices d'antigènes lors de la phase d'initiation de la réponse immunitaire antitumorale ont largement été décrits *in vitro* et *in vivo* par notre équipe et d'autres groupes ces dernières années ^{149,200,882,883}. Le rôle direct des OV et leurs mécanismes sur la phase effectrice de la réponse immunitaire n'ont à notre connaissance jamais été rapportés dans la littérature.

Notre équipe s'est donc récemment intéressée à l'effet direct du MV sur la phase effectrice de la réponse immunitaire antitumorale. Les premiers travaux sur ce sujet ont été réalisés par le Dr. C Achard pendant sa thèse et portaient sur les propriétés cytotoxiques acquises par les DC myéloïdes (mDC) et plasmacytoïdes (pDC) isolées des PBMC en conséquence d'une infection de cellules tumorales par le MV oncolytique ²⁰⁰. L'expression de TRAIL en surface des deux types de DC dépend de leur capacité à produire de l'IFN- α suite à un contact direct avec le virus ou avec des cellules de MPM infectées par le MV. Par ailleurs, le TLR7 et les senseurs cytoplasmiques RIG-I et MDA5 ont été montrés comme étant nécessaires à la détection du MV et responsables de l'induction de l'IFN- α chez les pDC tandis que seuls les RLR (RIG-I Like Receptors) sont impliqués chez les mDC. L'expression de TRAIL par les DC qui découle de la détection du MV permet à celles-ci d'être fonctionnellement cytotoxiques envers des cibles exprimant les récepteurs de mort. Enfin, la sécrétion de perforine est absente chez les deux types de DC et le granzyme B a été retrouvé fortement exprimé uniquement chez les pDC en réponse au MV.

Actuellement, nos travaux se portent sur l'implication des virus oncolytiques sur la fonction effectrice des lymphocytes T cytotoxiques. Une étude récente menée par l'équipe des Dr. C Münz et M Gannagé, à laquelle nous avons participé, a montré que l'antigène de tumeur NY-ESO-1 subit un transfert entre cellules de mélanome suivi d'un traitement classique par la voie du CMH-II ¹⁹³. Pour démontrer ce mécanisme, ils ont utilisé un modèle de co-culture allogénique de lignées tumorales composée de la lignée de mélanome M199 HLA-DP4pos (positif) n'exprimant pas l'antigène de tumeur NY-ESO-1 et la lignée d'adénocarcinome pulmonaire A549 HLA-DP4neg (négatif) transfectée avec un plasmide codant NY-ESO-1. Dans ce contexte, la lignée A549 vivante ou sous forme de débris cellulaires après avoir subi des cycles de congélation/décongélation libère l'antigène NY-ESO-1 dans le

surnageant. NY-ESO-1 est capté par la lignée M199, puis rejoint la voie endo-lysosomale pour être apprêté et présenté par les molécules HLA de classe II à un clone T CD4+ spécifique du complexe HLA-DP4/NY-ESO-1(155-170), le clone NY67, qui s'active et produit de l'IFN- γ .

Au vu de ces résultats, mon troisième projet de thèse a donc consisté à évaluer, dans un contexte d'immunothérapie oncolytique, la sensibilité des cellules de mélanome à la lyse par différents virus oncolytiques et leur effet *in vitro* sur le mécanisme de transfert intercellulaire de l'antigène NY-ESO-1 et par conséquent, sur la reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes T CD4+ effecteurs.

Dans cette étude, nous avons mis en place un modèle allogénique composé de la lignée cellulaire de mélanome M18 HLA-DP4neg qui exprime spontanément NY-ESO-1 (lignée donneuse de NY-ESO-1) et deux lignées cellulaires de mélanome HLA-DP4pos qui n'expriment pas NY-ESO-1 : M88 et M199 (lignées présentatrices de NY-ESO-1). Un modèle autologue a également été mis en place par la lignée de mélanome M6 qui est donneuse de NY-ESO-1 mais aussi présentatrice de l'antigène par la molécule HLA-DP4. Le clone NY67, un clone de lymphocyte T CD4+ spécifique capable de reconnaître les peptides NY-ESO-1 (157-170) présenté sur les molécules HLA-DP4, a été utilisé pour évaluer la présentation antigénique. Ainsi, nous avons choisi de ne pas utiliser de lignée transfectée avec NY-ESO-1 mais des lignées de mélanome qui l'expriment naturellement afin de se rapprocher au mieux de la réalité.

Dans un premier temps, nous avons évalué la sensibilité des lignées donneuses de NY-ESO-1 M6 et M18 à l'activité oncolytique du virus de la rougeole (MV). Le suivi par vidéomicroscopie nous a permis d'identifier un éclatement des cellules après l'infection par le MVeGFP caractérisé par une disparition brutale de la fluorescence verte lorsque les membranes cellulaires se rompent. La libération des antigènes de tumeurs intervient probablement à ce moment. Un marquage double positif à l'annexine V et à l'iodure de propidium (IP) nous a permis de confirmer l'induction de la mort cellulaire pour une partie des cellules. L'annexine V caractérise habituellement la mort cellulaire par apoptose et la perméabilité des membranes à l'IP correspond généralement à une mort par nécrose. Néanmoins, dans cette expérience il n'est pas possible de déterminer avec précision le type de mort impliquée. En effet, il faudrait réaliser des mesures de la mort sous forme de cinétique et évaluer les acteurs principaux des voies de mort cellulaire. De plus, le processus d'apoptose

est fréquemment altéré dans les cellules tumorales, et le type de mort induit est peut-être différent d'une lignée à l'autre. Dans l'étude du Dr. C Achard, la lignée de MPM Meso 31 mourrait très rapidement après infection par le MV tandis que la lignée Meso 163 prenait plusieurs jours supplémentaires pour mourir ²⁵⁶. D'autre part, on peut aussi noter que le MV bloque l'apoptose dans la cellule infectée par l'expression du facteur de virulence protéine C ²⁴¹ afin de prolonger le temps de réplication virale dans la cellule hôte. En effet, la protéine C favorise le processus de mitophagie entraînant une perte de mitochondries, organites essentiels à l'apoptose intrinsèque ⁸⁸⁵.

Ensuite, nous avons démontré dans les modèles allogénique et autologue que la lyse des lignées donneuses de NY-ESO-1 par le MV augmente considérablement la capacité des cellules tumorales présentatrices à stimuler le clone NY67. Une fois activé, nous avons montré la propriété cytotoxique du clone NY67 qui est capable de reconnaître et d'induire la lyse des cellules donneuses qui présentent NY-ESO-1 acquis par transfert intercellulaire.

De manière intéressante, le MV est le seul OV à provoquer la formation de syncytia correspondant à des cellules géantes multi-nucléées suite à des fusions cellulaires. Il est probable que ces fusions entre cellules entraînent un transfert de NY-ESO-1. Néanmoins, NY-ESO-1 n'est a priori pas présenté sur le CMH de classe II suite à un échange de cytoplasme. En effet, les travaux des Dr. C Munz et M Gannagé et de notre équipe ont montré que la présentation de NY-ESO-1 nécessite une endocytose, une maturation endosomale et la synthèse de nouvelles molécules de classe II du CMH. A l'inverse, aucune preuve de l'utilisation de la machinerie du CMH de classe I n'a été mise en évidence et l'implication des voies autophagiques dans l'accès de l'Ag à la voie de présentation HLA classe II a été exclu ¹⁹³.

Dans cette publication, plusieurs hypothèses pour expliquer comment NY-ESO-1 peut atteindre la voie classique du CMH de classe II ont été évoquées ¹⁹³. L'acquisition d'un phénotype phagocytaire au cours de la progression métastatique était la première hypothèse posée. En effet les cellules cancéreuses de mélanome ont été décrites comme ayant une activité de cannibalisme cellulaire qui leur permet d'engloutir d'autres cellules, y compris les lymphocytes morts ou vivants, dans le but principal de s'en nourrir. Ce processus est connu sous le nom d'entose ^{886,887}. Ainsi, l'activité phagocytaire des cellules tumorales de mélanome pourrait expliquer ce transfert d'antigène. La deuxième hypothèse donnée dans cette étude est l'implication de la voie du mélanosome, organite intracellulaire nécessaire à la livraison de

la mélanine des mélanocytes vers les kératinocytes ⁸⁸⁸. Là encore, cette possibilité ne peut être complètement exclue mais l'absence de séquence de ciblage au mélanosome sur NY-ESO-1 lui donne peu de légitimité. De plus, ce processus n'a été décrit que pour des antigènes de différenciation mélanocytaires localisés dans les mélanosomes. Une troisième explication est apportée par l'existence de jonctions lacunaires utilisées par les mélanocytes normaux pour transférer des antigènes entre cellules. La connexine 43 nécessaire à ce processus a cependant été montrée comme étant perdue lors de la progression du mélanome ⁸⁸⁹. Il serait donc intéressant d'étudier l'expression de cette protéine dans nos lignées pour s'en assurer. Enfin, la dernière possibilité est que NY-ESO-1 présent dans le milieu extracellulaire pourrait être endocyté comme il a déjà été rapporté pour les protéines EBNA dans les lignées cellulaires lymphoblastoïdes transformées par le virus d'Epstein-Barr.

Les hypothèses de la phagocytose de NY-ESO-1 associé à des fragments cellulaires ou d'une endocytose directe de NY-ESO-1 présent librement dans le surnageant sont les deux explications du transfert d'antigène les plus plausibles lors d'une lyse par le MV. Il n'est d'ailleurs pas exclu que ces deux mécanismes interviennent simultanément. En effet, dans notre étude, nous avons démontré par western blot la présence de la protéine NY-ESO-1 dans le milieu extracellulaire à la suite d'une infection par le MV. Chez la lignée donneuse M18, la quantité de NY-ESO-1 intracellulaire étaient largement supérieure à celle retrouvée après lyse par cycle FT ou par le MV. Lors du protocole expérimental mis en place pour réaliser le western blot, une étape de concentration suivie d'une élimination des débris cellulaires est nécessaire pour obtenir un résultat exploitable. Il est donc tout à fait possible que la fraction de NY-ESO-1 associée aux fragments cellulaires soit éliminée lors du traitement des échantillons. Ainsi, les bandes visibles (40 kDa et 20 kDa) bien plus faibles dans les conditions MV et FT par rapport à la condition « cellules » correspondraient seulement aux protéines NY-ESO-1 libres dans le surnageant. D'autre part, les cycles de FT éclatant un plus grand nombre de cellules que lors d'une lyse par le MV, les bandes visibles étaient donc plus intenses dans la condition FT. Ainsi, la présence de NY-ESO-1 libres et associés à des débris cellulaires est un premier argument qui pourrait corroborer la théorie de l'intervention des deux processus simultanément et qui nécessite sans nul doute une plus grande investigation.

En parallèle de l'étude menée sur le MV, nous avons testé la capacité de transfert intercellulaire de NY-ESO-1 dans les modèles allogéniques (M18 et M88) et autologues (M6)

après infection des cellules donneuses avec d'autres OV ; la souche Copenhague du virus de la vaccine (VV), la souche VSVdelta51 du virus de la stomatite vésiculaire (VSV), la souche rQNestin34.5v.1 du virus de l'Herpès simplex de type I (HSV), une souche d'adénovirus Ad-TD-RFP et une souche d'entérovirus Rigvir. Nous avons mis en évidence que lorsque les cellules tumorales donneuses de NY-ESO-1 sont infectées de manière productive par le VV, le VSV, le HSV et l'EV, cela induit une lyse et une augmentation du transfert et de la présentation de NY-ESO-1. A l'inverse, l'adénovirus n'induit pas ce mécanisme dans notre modèle. En effet, l'adénovirus ne se propage pas dans les lignées M6 et M18 mais semble avoir déclenché uniquement la mort des cellules M18 contrairement à M6 qui paraissait normal en culture. Les cellules M18 présentaient une morphologie apoptotique, ronde avec de grandes vacuoles pendant au moins 3 jours. L'adénovirus est connu pour avoir un cycle lent et utiliser la cellule hôte comme une plateforme de réplication intense avant la libération des virions plusieurs jours post-infection ³³⁵. Une infection plus longue aurait peut-être été nécessaire pour observer une lyse des cellules. Néanmoins, il semblerait que les cellules aient déclenché un processus de mort cellulaire dû à la présence du virus ce qui empêche peut-être la propagation de l'adénovirus. Par ailleurs, l'adénovirus induit bien une perméabilisation de la lignée M18 mais aussi de la lignée M6 confirmant l'état de mort cellulaire provoqué par le virus. Le virus n'induisant pas de mort lytique des cellules, l'antigène NY-ESO-1 n'est donc pas libéré dans le milieu extracellulaire. Concernant l'entérovirus, malgré que notre marquage par le TOPRO indique une absence de la mort cellulaire de la lignée M6 après infection par ce virus, un transfert de NY-ESO-1 a pourtant été observé. Ce résultat pourrait s'expliquer par une vague de mort cellulaire induite par l'EV qui interviendrait en début d'infection libérant assez de NY-ESO-1 dans le surnageant pour un transfert intercellulaire mais avec une infection ensuite rapidement contrôlée. Ainsi, les cellules vivantes ont peut-être déjà repris l'avantage à 72H.

Ensemble ces résultats montrent pour la première fois que la libération dans le milieu extracellulaire de TAA tels que NY-ESO-1 suite à l'infection par les virus oncolytiques de la rougeole, de la vaccine, de la stomatite vésiculaire, de l'herpès et de l'entérovirus, provoque la capture de NY-ESO-1 par les cellules tumorales voisines vivantes. NY-ESO-1 est ensuite apprêté et présenté sous forme de peptides sur les molécules HLA de classe II, où il peut être reconnu par des lymphocytes T CD4+ spécifiques. Ainsi, les virus oncolytiques peuvent améliorer la phase effectrice de la réponse immunitaire antitumorale en favorisant le

chargement des cellules tumorales avec des antigènes tumoraux et participent à une meilleure reconnaissance par les lymphocytes T cytotoxiques. Cela est particulièrement intéressant dans le cas de NY-ESO-1. En effet, il a été montré par marquage histochimique qu'au sein d'une même tumeur, l'expression de NY-ESO-1 est hétérogène. Ainsi, sur 120 patients souffrant de mélanome, 44% exprimaient NY-ESO-1 dans leur tumeur avec rarement 100% des cellules NY-ESO-1 positives ⁸⁹⁰. Les OV seraient donc des agents intéressants pour provoquer le chargement en antigène des cellules tumorales n'exprimant pas NY-ESO-1 et ainsi sensibiliser toutes les cellules tumorales à une reconnaissance spécifique par les LT CD4+ cytotoxiques.

NY-ESO-1 est un des antigènes de tumeur les plus prometteurs en raison des réponses lymphocytaires T CD8+ et CD4+ et des anticorps monoclonaux dirigés contre ce TAA retrouvé chez des patients atteints de cancer. De plus, son expression chez les cellules saines est restreinte à des sites immunitairement privilégiés comme le testicule et le trophoblaste des femmes enceintes faisant de lui un vrai antigène de tumeur. Des transferts adoptifs de cellules T basés sur le ciblage de NY-ESO-1 sont d'ailleurs étudiés en clinique actuellement ^{891,892}. Il a été rapporté en 2008 notamment le cas d'un patient souffrant de mélanome traité par un transfert adoptif d'un clone T CD4+ autologue spécifique du même complexe HLA-DP4/NY-ESO-1(155-170) que le clone NY67 utilisé dans notre étude ⁶⁸. Cela a conduit à la rémission à long terme de ce patient. Depuis cette équipe en collaboration avec l'équipe du Dr. S Rosenberg développe des transferts de lymphocytes T autologues exprimant un récepteur à l'antigène chimérique (CAR) qui reconnaît ce même complexe ⁶⁷. Le traitement de patients atteints de mélanome et de sarcome synovial avec des cellules T portant un CAR spécifique de ce complexe a donné des réponses cliniques objectives. De plus, ce complexe HLA/peptide est intéressant pour l'immunothérapie, car HLA-DP4 est un allèle fréquent présent dans plus de 50% de la population caucasienne ⁸⁹³.

La présence de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques d'antigènes tumoraux fonctionnels infiltrant la tumeur est considérée comme un facteur pronostic positif pour les patients ⁸⁹⁴. Ils peuvent éliminer les cellules cancéreuses existantes, mais aussi établir une surveillance active, continue et à long terme contre les cellules cancéreuses susceptibles de rechuter. Les réponses des cellules T antitumorales promues par immunothérapie oncolytique

ont été mises en évidence en préclinique chez la souris ⁸⁹⁵ et en clinique chez l'Homme. La phase I réalisée chez des patientes atteintes de cancer de l'ovaire chimiorésistant traitées par le virus de la rougeole démontre la présence de LT CD8+ spécifiques de la tumeur circulant dans le sang ²⁰². D'autre part, un essai clinique de phase II multicentrique a évalué l'effet d'un HSV, le T-Vec, sur l'immunité antitumorale locale et distante par injection intra-lésionnelle directe chez 50 patients atteints de mélanome métastatique non opérable de stade IIIc et IV. Le virus induit des réponses T effectrices CD8+ spécifiques de l'antigène de tumeur MART-1 (Melanoma-associated antigen recognized by T cells) locales et systémiques ⁶⁸¹. Il est donc possible que le nouveau mécanisme de stimulation de la réponse immunitaire par les OV que j'ai mis en évidence rentre en jeu dans les effets immunothérapeutiques obtenus avec les OV en clinique.

En 2015, l'immunothérapie oncolytique a rencontré son premier succès avec l'approbation du T-Vec (Imlygic d'Amgen) par la Food and Drug Administration des États-Unis et l'Agence européenne du médicament pour le traitement du mélanome métastatique ¹¹⁷. Or le mélanome métastatique a connu des succès thérapeutiques récemment avec l'utilisation des inhibiteurs de point de contrôle immunitaire (CPI : anti-CTLA4, anti-PD1, anti-PD-L1) qui ont été mis sur le marché quelques années avant le T-Vec. Le T-Vec utilisé seul permet d'apporter un bénéfice clinique similaire à l'utilisation des CPI seuls, avec un recul sur son utilisation plus faible que les CPI.

Les actions des CPI et de l'immunothérapie oncolytique sont complémentaires en levant d'une part les freins immunitaires et en activant efficacement d'autre part les réponses immunitaires cytotoxiques antitumorales. C'est pourquoi des essais cliniques de phase III « Fast track » ont été lancés pour évaluer l'utilisation combinée du T-Vec avec les CPI. Les premiers résultats cliniques de phase I réalisés en parallèle ont été publiés récemment et sont prometteurs puisque la combinaison fait mieux que chacun des agents utilisés seuls ^{203,204}. La combinaison du T-Vec et de l'ipilimumab est bien tolérée avec une efficacité clinique supérieure à celle du T-Vec ou de l'ipilimumab seul (réponse durable \geq 6 mois de 44% ; survie globale à 18 mois de 67%) ²⁰⁴. La combinaison pembrolizumab en monothérapie (anti-PD-1) versus la combinaison pembrolizumab et T-Vec a été évaluée en phase I chez 21 patients mélanome ²⁰³. La combinaison a montré des taux de réponse globale (62%) et complète (33%) élevés avec l'induction d'infiltration de LT CD8+ et une signature IFN- γ positive dans les

tumeurs. Il est important de noter que les patients ayant un faible taux d'infiltration de cellules immunitaires avant le traitement ont bien répondu à la combinaison, suggérant une sensibilisation des tumeurs immunologiquement «froides» (ou immunosuppressives) par les OV. Outre les anticorps dirigés contre CTLA-4 et l'axe PD1-PDL1 qui sont les CPI les plus avancés cliniquement, d'autres agents ciblant d'autres points de contrôle immunitaires sont activement étudiés (LAG-3, TIM-3, TIGIT etc.). La combinaison de ces molécules émergentes avec les OV pourrait donc apporter des nouvelles approches attrayantes pour le traitement du cancer ⁸⁹⁶.

✓ Conclusion

L'enthousiasme actuel autour des nouvelles stratégies thérapeutiques telles que les inhibiteurs de points de contrôle et l'immunothérapie oncolytique administrées seules ou en combinaison, a largement été justifié par de nombreuses preuves précliniques et cliniques. Le nombre d'agents d'immunothérapies approuvés pour leur commercialisation contre un large panel de cancers a considérablement augmenté ces dernières années. Ainsi, l'espoir de voir un jour apparaître des traitements immunothérapeutiques personnalisés basés sur le profil génétique, moléculaire et immunitaire individuel est un objectif futur qui semble de plus en plus réalisable malgré de nombreux défis encore à surmonter, et l'immunothérapie oncolytique y tiendra probablement une grande place.

RÉFÉRENCES

1. Patel, S. C. & Dowell, J. E. Modern management of malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer (Auckland, N.Z.)* **7**, 63–72 (2016).
2. Neumann, V., Löseke, S., Nowak, D., Herth, F. J. F. & Tannapfel, A. Malignant pleural mesothelioma: incidence, etiology, diagnosis, treatment, and occupational health. *Dtsch. Arztebl. Int.* **110**, 319–26 (2013).
3. Bianchi, C. & Bianchi, T. Malignant mesothelioma: global incidence and relationship with asbestos. *Ind. Health* **45**, 379–87 (2007).
4. Scherpereel, A. Malignant pleural mesothelioma: new treatments, new hopes? *Eur. Respir. J.* **49**, 1700319 (2017).
5. McDonald, J. C. & McDonald, A. D. The epidemiology of mesothelioma in historical context. *Eur. Respir. J.* **9**, 1932–1942 (1996).
6. Smith, D. D. in *Malignant Mesothelioma* 3–20 (Springer-Verlag, 2005). doi:10.1007/0-387-28274-2_1
7. Røe, O. D. & Stella, G. M. Malignant pleural mesothelioma: history, controversy and future of a manmade epidemic. *Eur. Respir. Rev.* **24**, 115–131 (2015).
8. WAGNER, J. C., SLEGGES, C. A. & MARCHAND, P. Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province. *Br. J. Ind. Med.* **17**, 260–71 (1960).
9. Scherpereel, A., Grigoriu, B. & Astoul, P. Cours du GOLF 2008 Autres cancers thoraciques Mésothéliome pleural malin : biologie et diagnostic Other thoracic cancers Malignant pleural mesothelioma: biology and diagnosis. *Rev Mal Respir* **25**, 3–183 (2008).
10. Sporn, T. A. in *Pathology of Asbestos-Associated Diseases* 1–10 (Springer Berlin Heidelberg, 2014). doi:10.1007/978-3-642-41193-9_1
11. World Health Organization. Arsenic, Metals, Fibres and Dusts. *IARC Monogr.* **100C**, (2012).
12. Bianchi, C. *et al.* Latency periods in asbestos-related mesothelioma of the pleura. *Eur. J. Cancer Prev.* **6**, 162–6 (1997).
13. Iwatsubo, Y. *et al.* Pleural mesothelioma: dose-response relation at low levels of asbestos exposure in a French population-based case-control study. *Am. J. Epidemiol.* **148**, 133–42 (1998).
14. Lippmann, M. Effects of fiber characteristics on lung deposition, retention, and disease. *Environ. Health Perspect.* **88**, 311–7 (1990).
15. Stanton, M. F. *et al.* Carcinogenicity of fibrous glass: pleural response in the rat in relation to fiber dimension. *J. Natl. Cancer Inst.* **58**, 587–603 (1977).
16. Adamson, I. Y. & Bowden, D. H. Pulmonary reaction to long and short asbestos fibers is independent of fibroblast growth factor production by alveolar macrophages. *Am. J. Pathol.* **137**, 523–9 (1990).
17. Mitchev, K., Dumortier, P. & De Vuyst, P. ‘Black Spots’ and hyaline pleural plaques on the parietal pleura of 150 urban necropsy cases. *Am. J. Surg. Pathol.* **26**, 1198–206 (2002).
18. Donaldson, K., Murphy, F. A., Duffin, R. & Poland, C. A. Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. *Part. Fibre Toxicol.* **7**, 5 (2010).
19. Thu, G. O. *et al.* Is there an association between SV40 contaminated polio vaccine and lymphoproliferative disorders? An age–period–cohort analysis on Norwegian data from 1953 to 1997. doi:10.1002/ijc.21603
20. Cicala, C., Pompetti, F. & Carbone, M. SV40 induces mesotheliomas in hamsters. *Am. J. Pathol.* **142**, 1524–33 (1993).
21. Carbone, M., Kratzke, R. A. & Testa, J. R. The pathogenesis of mesothelioma. *Semin. Oncol.* **29**, 2–17 (2002).
22. Bocchetta, M. *et al.* The SV40 Large T Antigen-p53 Complexes Bind and Activate the Insulin-like Growth Factor-I Promoter Stimulating Cell Growth. *Cancer Res.* **68**, 1022–1029 (2008).
23. Yang, H., Testa, J. R. & Carbone, M. Mesothelioma epidemiology, carcinogenesis, and pathogenesis. *Curr. Treat. Options Oncol.* **9**, 147–57 (2008).
24. Carbone, M. *et al.* A mesothelioma epidemic in Cappadocia: scientific developments and unexpected social outcomes. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 147–154 (2007).
25. Thompson, J. K., Westbom, C. M. & Shukla, A. Malignant mesothelioma: development to therapy. *J. Cell. Biochem.* **115**, 1–7 (2014).
26. Moalli, P. A., MacDonald, J. L., Goodglick, L. A. & Kane, A. B. Acute injury and regeneration of the mesothelium in response to asbestos fibers. *Am. J. Pathol.* **128**, 426–45 (1987).
27. Shukla, A. *et al.* Multiple roles of oxidants in the pathogenesis of asbestos-induced diseases. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 1117–29 (2003).
28. Benedetti, S., Nuvoli, B., Catalani, S. & Galati, R. Reactive oxygen species a double-edged sword for mesothelioma. *Oncotarget* **6**, 16848–65 (2015).
29. Jean, D. *et al.* Syntenic relationships between genomic profiles of fiber-induced murine and human malignant mesothelioma. *Am. J. Pathol.* **178**, 881–94 (2011).

30. Xiao, G.-H. *et al.* The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, inhibits cell proliferation and cell cycle progression by repressing cyclin D1 expression. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 2384–94 (2005).
31. Poulidakos, P. I. *et al.* Re-expression of the tumor suppressor NF2/merlin inhibits invasiveness in mesothelioma cells and negatively regulates FAK. *Oncogene* **25**, 5960–5968 (2006).
32. Prins, J. B. *et al.* The gene for the cyclin-dependent-kinase-4 inhibitor, CDKN2A, is preferentially deleted in malignant mesothelioma. *Int. J. Cancer* **75**, 649–53 (1998).
33. Ladanyi, M. Implications of P16/CDKN2A deletion in pleural mesotheliomas. *Lung Cancer* **49**, S95–S98 (2005).
34. Jean, D., Daubriac, J., Le Pimpec-Barthes, F., Galateau-Salle, F. & Jaurand, M.-C. Molecular Changes in Mesothelioma With an Impact on Prognosis and Treatment. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **136**, 277–293 (2012).
35. Qi, F. *et al.* Continuous Exposure to Chrysotile Asbestos Can Cause Transformation of Human Mesothelial Cells via HMGB1 and TNF- α Signaling. *Am. J. Pathol.* **183**, 1654–1666 (2013).
36. Laveck, M. A., Somers, A. N., Moore, L. L., Gerwin, B. I. & Lechner, J. F. Dissimilar peptide growth factors can induce normal human mesothelial cell multiplication. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **24**, 1077–84 (1988).
37. Zanella, C. L., Posada, J., Tritton, T. R. & Mossman, B. T. Asbestos causes stimulation of the extracellular signal-regulated kinase 1 mitogen-activated protein kinase cascade after phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* **56**, 5334–8 (1996).
38. Lee, T. C. *et al.* Normal human mesothelial cells and mesothelioma cell lines express insulin-like growth factor I and associated molecules. *Cancer Res.* **53**, 2858–64 (1993).
39. Cacciotti, P. *et al.* SV40 replication in human mesothelial cells induces HGF/Met receptor activation: a model for viral-related carcinogenesis of human malignant mesothelioma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 12032–7 (2001).
40. Metheny-Barlow, L. J., Flynn, B., van Gijssel, H. E., Marrogi, A. & Gerwin, B. I. Paradoxical Effects of Platelet-Derived Growth Factor-A Overexpression in Malignant Mesothelioma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **24**, 694–702 (2001).
41. Hirano, H. *et al.* Expression of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinase, collagens, and Ki67 antigen in pleural malignant mesothelioma: an immunohistochemical and electron microscopic study. *Med. Electron Microsc.* **35**, 16–23 (2002).
42. Li, Y. & Heldin, P. Hyaluronan production increases the malignant properties of mesothelioma cells. *Br. J. Cancer* **85**, 600–7 (2001).
43. Bajaj, M. S., Pendurthi, U., Koenig, K., Pueblitz, S. & Idell, S. Tissue factor pathway inhibitor expression by human pleural mesothelial and mesothelioma cells. *Eur. Respir. J.* **15**, 1069–78 (2000).
44. Bellacosa, A., Kumar, C. C., Cristofano, A. Di & Testa, J. R. in *Advances in cancer research* **94**, 29–86 (2005).
45. Port, J. & Murphy, D. J. Mesothelioma: Identical Routes to Malignancy from Asbestos and Carbon Nanotubes. *Curr. Biol.* **27**, R1173–R1176 (2017).
46. Carbone, M. *et al.* Malignant mesothelioma: facts, myths, and hypotheses. *J. Cell. Physiol.* **227**, 44–58 (2012).
47. Bibby, A. C. *et al.* Malignant pleural mesothelioma: an update on investigation, diagnosis and treatment. *Eur. Respir. Rev.* **25**, 472–486 (2016).
48. Wang, Z. J. *et al.* Malignant Pleural Mesothelioma: Evaluation with CT, MR Imaging, and PET. *RadioGraphics* **24**, 105–119 (2004).
49. Rodríguez Panadero, F. Diagnosis and Treatment of Malignant Pleural Mesothelioma. *Arch. Bronconeumol. (English Ed.)* **51**, 177–184 (2015).
50. Henderson, D. W., Reid, G., Kao, S. C., Zandwijk, N. van & Klebe, S. Challenges and controversies in the diagnosis of mesothelioma: Part 1. Cytology-only diagnosis, biopsies, immunohistochemistry, discrimination between mesothelioma and reactive mesothelial hyperplasia, and biomarkers. *J. Clin. Pathol.* **66**, 847–853 (2013).
51. Rakha, E. A. *et al.* The sensitivity of cytologic evaluation of pleural fluid in the diagnosis of malignant mesothelioma. *Diagn. Cytopathol.* **38**, 874–879 (2010).
52. Chung, C. T.-S. *et al.* FISH assay development for the detection of p16/CDKN2A deletion in malignant pleural mesothelioma. *J. Clin. Pathol.* **63**, 630–4 (2010).
53. Cigognetti, M. *et al.* BAP1 (BRCA1-associated protein 1) is a highly specific marker for differentiating mesothelioma from reactive mesothelial proliferations. *Mod. Pathol.* **28**, 1043–1057 (2015).
54. Husain, A. N. *et al.* Guidelines for Pathologic Diagnosis of Malignant Mesothelioma: 2012 Update of the Consensus Statement from the International Mesothelioma Interest Group. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **137**, 647–667 (2013).
55. Galateau-Salle, F., Churg, A., Roggli, V. & Travis, W. D. The 2015 World Health Organization Classification

- of Tumors of the Pleura: Advances since the 2004 Classification. *J. Thorac. Oncol.* **11**, 142–154 (2016).
56. Scherpereel, A. *et al.* Guidelines of the European Respiratory Society and the European Society of Thoracic Surgeons for the management of malignant pleural mesothelioma. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* **35**, 479–495 (2010).
 57. Ray, M. & Kindler, H. L. Malignant Pleural Mesothelioma: An Update on Biomarkers and Treatment. *Chest* **136**, 888–896 (2009).
 58. Robinson, B. W. *et al.* Mesothelin-family proteins and diagnosis of mesothelioma. *Lancet* **362**, 1612–1616 (2003).
 59. Hjerpe, A. *et al.* Guidelines for cytopathologic diagnosis of epithelioid and mixed type malignant mesothelioma. Complementary statement from the International Mesothelioma Interest Group, also endorsed by the International Academy of Cytology and the Papanicolaou Society of Cytopathology. *Cytojournal* **12**, 26 (2015).
 60. Dahl, I. M., Solheim, O. P., Erikstein, B. & Müller, E. A longitudinal study of the hyaluronan level in the serum of patients with malignant mesothelioma under treatment. Hyaluronan as an indicator of progressive disease. *Cancer* **64**, 68–73 (1989).
 61. Hollevoet, K. *et al.* Soluble Mesothelin, Megakaryocyte Potentiating Factor, and Osteopontin as Markers of Patient Response and Outcome in Mesothelioma. *J. Thorac. Oncol.* **6**, 1930–1937 (2011).
 62. Grigoriu, B.-D. *et al.* Utility of osteopontin and serum mesothelin in malignant pleural mesothelioma diagnosis and prognosis assessment. *Clin. Cancer Res.* **13**, 2928–35 (2007).
 63. Pass, H. I. *et al.* Fibulin-3 as a Blood and Effusion Biomarker for Pleural Mesothelioma. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1115050> (2012). doi:10.1056/NEJMoa1115050
 64. Gueugnon, F. *et al.* Identification of novel markers for the diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Am. J. Pathol.* **178**, 1033–42 (2011).
 65. Blanquart, C. *et al.* CCL2, Galectin-3, and SMRP Combination Improves the Diagnosis of Mesothelioma in Pleural Effusions. *J. Thorac. Oncol.* **7**, 883–889 (2012).
 66. Scherpereel, A., Grigoriu, B. & Astoul, P. Cours du GOLF 2008 Autres cancers thoraciques Mésothéliome pleural malin : biologie et diagnostic Other thoracic cancers Malignant pleural mesothelioma: biology and diagnosis. *Rev Mal Respir* **25**, 3–183 (2008).
 67. Bonelli, M. A., Fumarola, C., La Monica, S. & Alfieri, R. New therapeutic strategies for malignant pleural mesothelioma. *Biochem. Pharmacol.* **123**, 8–18 (2017).
 68. Sugarbaker, D. J. & Wolf, A. S. Surgery for malignant pleural mesothelioma. *Expert Rev. Respir. Med.* **4**, 363–372 (2010).
 69. Rice, D. in *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer* **189**, 97–125 (2011).
 70. Dhalluin, X. & Scherpereel, A. in *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer* **189**, 127–147 (2011).
 71. Chatelut, E. [Pharmacology of platinum compounds: differences between the three molecules and factors of interpatient variability]. *Bull. Cancer* **98**, 1253–61 (2011).
 72. Chattopadhyay, S., Moran, R. G. & Goldman, I. D. Pemetrexed: biochemical and cellular pharmacology, mechanisms, and clinical applications. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 404–417 (2007).
 73. Vogelzang, N. J. *et al.* Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. *J. Clin. Oncol.* **21**, 2636–44 (2003).
 74. Ceresoli, G. L. *et al.* Pemetrexed plus carboplatin in elderly patients with malignant pleural mesothelioma: combined analysis of two phase II trials. *Br. J. Cancer* **99**, 51–56 (2008).
 75. Ak, G., Metintas, S., Akarsu, M. & Metintas, M. The effectiveness and safety of platinum-based pemetrexed and platinum-based gemcitabine treatment in patients with malignant pleural mesothelioma. *BMC Cancer* **15**, 510 (2015).
 76. Van Schil, P. E. *et al.* Trimodality therapy for malignant pleural mesothelioma: results from an EORTC phase II multicentre trial. *Eur. Respir. J.* **36**, 1362–9 (2010).
 77. Garland, L. L. *et al.* Phase II Study of Erlotinib in Patients With Malignant Pleural Mesothelioma: A Southwest Oncology Group Study. *J. Clin. Oncol.* **25**, 2406–2413 (2007).
 78. Lee, C. W. *et al.* A phase II trial of gefitinib in patients with malignant pleural mesothelioma (MPM). *J. Clin. Oncol.* **26**, 14614–14614 (2008).
 79. Kalra, N. *et al.* Efficacy of anti-insulin-like growth factor I receptor monoclonal antibody cixutumumab in mesothelioma is highly correlated with insulin growth factor-I receptor sites/cell. *Int. J. cancer* **131**, 2143–52 (2012).
 80. Jagadeeswaran, R. *et al.* Functional Analysis of c-Met/Hepatocyte Growth Factor Pathway in Malignant

- Pleural Mesothelioma. *Cancer Res.* **66**, 352–361 (2006).
81. Kanteti, R. *et al.* PI3 Kinase Pathway and MET Inhibition is Efficacious in Malignant Pleural Mesothelioma. *Sci. Rep.* **6**, 32992 (2016).
 82. Ohta, Y. *et al.* VEGF and VEGF type C play an important role in angiogenesis and lymphangiogenesis in human malignant mesothelioma tumours. *Br. J. Cancer* **81**, 54–61 (1999).
 83. Bertino, P. *et al.* Imatinib mesylate enhances therapeutic effects of gemcitabine in human malignant mesothelioma xenografts. *Clin. Cancer Res.* **14**, 541–8 (2008).
 84. Zalcman, G. *et al.* Bevacizumab for newly diagnosed pleural mesothelioma in the Mesothelioma Avastin Cisplatin Pemetrexed Study (MAPS): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet* **387**, 1405–1414 (2016).
 85. Vandermeers, F. *et al.* The role of epigenetics in malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer* **81**, 311–318 (2013).
 86. Ramalingam, S. S. *et al.* Phase II study of belinostat (PXD101), a histone deacetylase inhibitor, for second line therapy of advanced malignant pleural mesothelioma. *J. Thorac. Oncol.* **4**, 97–101 (2009).
 87. Krug, L. M. *et al.* Vorinostat in patients with advanced malignant pleural mesothelioma who have progressed on previous chemotherapy (VANTAGE-014): a phase 3, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol.* **16**, 447–456 (2015).
 88. Leigh, R. A. & Webster, I. Lymphocytic infiltration of pleural mesothelioma and its significance for survival. *S. Afr. Med. J.* **61**, 1007–9 (1982).
 89. Rosenberg, S. A. & Lotze, M. T. Cancer Immunotherapy Using Interleukin-2 and Interleukin-2-Activated Lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **4**, 681–709 (1986).
 90. Powell, A., Creaney, J., Broomfield, S., Van Bruggen, I. & Robinson, B. Recombinant GM-CSF plus autologous tumor cells as a vaccine for patients with mesothelioma. *Lung Cancer* **52**, 189–197 (2006).
 91. Serman, D. H. *et al.* A Phase I Trial of Repeated Intrapleural Adenoviral-mediated Interferon- β Gene Transfer for Mesothelioma and Metastatic Pleural Effusions. *Mol. Ther.* **18**, 852–860 (2010).
 92. Serman, D. H. *et al.* A Trial of Intrapleural Adenoviral-mediated Interferon- α 2b Gene Transfer for Malignant Pleural Mesothelioma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **184**, 1395–1399 (2011).
 93. Stevenson, J. P. *et al.* Immunological effects of the TGF β -blocking antibody GC1008 in malignant pleural mesothelioma patients. *Oncoimmunology* **2**, e26218 (2013).
 94. Baldo, P. & Cecco, S. Amatuximab and novel agents targeting mesothelin for solid tumors. *Onco. Targets. Ther.* **10**, 5337–5353 (2017).
 95. Buchbinder, E. I. & Desai, A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am. J. Clin. Oncol.* **39**, 98–106 (2016).
 96. Bour-Jordan, H. *et al.* Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/B7 family. *Immunol. Rev.* **241**, 180–205 (2011).
 97. Francisco, L. M., Sage, P. T. & Sharpe, A. H. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol. Rev.* **236**, 219–242 (2010).
 98. Buchbinder, E. & Hodi, F. S. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 and immune checkpoint blockade. *J. Clin. Invest.* **125**, 3377–3383 (2015).
 99. Brahmer, J. R. *et al.* Management of Immune-Related Adverse Events in Patients Treated With Immune Checkpoint Inhibitor Therapy: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Oncol.* JCO2017776385 (2018). doi:10.1200/JCO.2017.77.6385
 100. Wu, L., Yun, Z., Tagawa, T., Rey-McIntyre, K. & de Perrot, M. CTLA-4 blockade expands infiltrating T cells and inhibits cancer cell repopulation during the intervals of chemotherapy in murine mesothelioma. *Mol. Cancer Ther.* **11**, 1809–19 (2012).
 101. Lesterhuis, W. J. *et al.* Synergistic Effect of CTLA-4 Blockade and Cancer Chemotherapy in the Induction of Anti-Tumor Immunity. *PLoS One* **8**, e61895 (2013).
 102. Wu, L. *et al.* Targeting the inhibitory receptor CTLA-4 on T cells increased abscopal effects in murine mesothelioma model. *Oncotarget* **6**, (2015).
 103. Calabrò, L. *et al.* Efficacy and safety of an intensified schedule of tremelimumab for chemotherapy-resistant malignant mesothelioma: an open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Respir. Med.* **3**, 301–309 (2015).
 104. Maio, M. *et al.* Tremelimumab as second-line or third-line treatment in relapsed malignant mesothelioma (DETERMINE): a multicentre, international, randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet Oncol.* **18**, 1261–1273 (2017).
 105. Alley, E. W. *et al.* Clinical safety and activity of pembrolizumab in patients with malignant pleural mesothelioma (KEYNOTE-028): preliminary results from a non-randomised, open-label, phase 1b trial.

- Lancet Oncol.* **18**, 623–630 (2017).
106. Boisgerault, N. *et al.* Oncolytic virotherapy for human malignant mesothelioma: recent advances. *Oncolytic virotherapy* **4**, 133–40 (2015).
 107. Kelly, E. & Russell, S. J. History of Oncolytic Viruses: Genesis to Genetic Engineering. *Mol. Ther.* **15**, 651–659 (2007).
 108. Pasquinucci, G. Possible effect of measles on leukaemia. *Lancet (London, England)* **1**, 136 (1971).
 109. Gross, S. Measles and leukaemia. *Lancet (London, England)* **1**, 397–8 (1971).
 110. Bierman, H. R. *et al.* Remissions in leukemia of childhood following acute infectious disease. Staphylococcus and streptococcus, varicella, and feline panleukopenias. *Cancer* **6**, 591–605 (1953).
 111. Zygiert, Z. HODGKIN'S DISEASE: REMISSIONS AFTER MEASLES. *Lancet* **297**, 593 (1971).
 112. Taqi, A. M., Abdurrahman, M. B., Yakubu, A. M. & Fleming, A. F. REGRESSION OF HODGKIN'S DISEASE AFTER MEASLES. *Lancet* **317**, 1112 (1981).
 113. Bluming, A. & Ziegler, J. REGRESSION OF BURKITT'S LYMPHOMA IN ASSOCIATION WITH MEASLES INFECTION. *Lancet* **298**, 105–106 (1971).
 114. Southam, C. M. & Moore, A. E. Clinical studies of viruses as antineoplastic agents, with particular reference to egypt 101 virus. *Cancer* **5**, 1025–1034 (1952).
 115. Doniņa, S. *et al.* Adapted ECHO-7 virus Rigvir immunotherapy (oncolytic virotherapy) prolongs survival in melanoma patients after surgical excision of the tumour in a retrospective study. *Melanoma Res.* **25**, 421–6 (2015).
 116. Garber, K. China Approves World's First Oncolytic Virus Therapy For Cancer Treatment. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **98**, 298–300 (2006).
 117. Rehman, H., Silk, A. W., Kane, M. P. & Kaufman, H. L. Into the clinic: Talimogene laherparepvec (T-VEC), a first-in-class intratumoral oncolytic viral therapy. *J. Immunother. cancer* **4**, 53 (2016).
 118. Russell, S. J. & Peng, K.-W. Viruses as anticancer drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 326–333 (2007).
 119. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
 120. Sherr, C. J. & McCormick, F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* **2**, 103–12 (2002).
 121. Burkhardt, D. L. & Sage, J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 671–682 (2008).
 122. Adams, J. M. & Cory, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**, 1324–1337 (2007).
 123. Evan, G. & Littlewood, T. A matter of life and cell death. *Science* **281**, 1317–22 (1998).
 124. Blasco, M. A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 611–622 (2005).
 125. Hanahan, D. & Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**, 353–64 (1996).
 126. Polyak, K. & Weinberg, R. A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 265–273 (2009).
 127. Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J. & Nieto, M. A. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* **139**, 871–890 (2009).
 128. Yilmaz, M. & Christofori, G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* **28**, 15–33 (2009).
 129. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–74 (2011).
 130. Hsu, P. P. & Sabatini, D. M. Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. *Cell* **134**, 703–707 (2008).
 131. Kim, R., Emi, M. & Tanabe, K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* **121**, 1–14 (2007).
 132. Berdasco, M. & Esteller, M. Aberrant Epigenetic Landscape in Cancer: How Cellular Identity Goes Awry. *Dev. Cell* **19**, 698–711 (2010).
 133. Talmadge, J. E. Immune cell infiltration of primary and metastatic lesions: Mechanisms and clinical impact. *Semin. Cancer Biol.* **21**, 131–138 (2011).
 134. Pagès, F. *et al.* Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* **29**, 1093–1102 (2010).
 135. Grivennikov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883–99 (2010).
 136. Buller, R. M., Smith, G. L., Cremer, K., Notkins, A. L. & Moss, B. Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype. *Nature* **317**, 813–5 (1985).
 137. Haddad, D. Genetically Engineered Vaccinia Viruses As Agents for Cancer Treatment, Imaging, and Transgene Delivery. *Front. Oncol.* **7**, 96 (2017).
 138. Mansour, M., Palese, P. & Zamarin, D. Oncolytic Specificity of Newcastle Disease Virus Is Mediated by

- Selectivity for Apoptosis-Resistant Cells. *J. Virol.* **85**, 6015–6023 (2011).
139. Delatouche, R. *et al.* Design of pH responsive clickable prodrugs applied to histone deacetylase inhibitors: A new strategy for anticancer therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **85**, 862–872 (2013).
 140. Denis, I. *et al.* Vorinostat–Polymer Conjugate Nanoparticles for Acid-Responsive Delivery and Passive Tumor Targeting. *Biomacromolecules* **15**, 4534–4543 (2014).
 141. Parato, K. A., Senger, D., Forsyth, P. A. J. & Bell, J. C. Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 965–976 (2005).
 142. BURNET, M. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br. Med. J.* **1**, 779–86 (1957).
 143. Ribatti, D. The concept of immune surveillance against tumors. The first theories. *Oncotarget* **8**, 7175–7180 (2017).
 144. Shankaran, V. *et al.* IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107–1111 (2001).
 145. Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* **21**, 137–148 (2004).
 146. Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity’s Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science (80-.)*. **331**, 1565–1570 (2011).
 147. Kim, R., Emi, M. & Tanabe, K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* **121**, 1–14 (2007).
 148. Mastrangelo, M. J. *et al.* Intratumoral recombinant GM-CSF-encoding virus as gene therapy in patients with cutaneous melanoma. *Cancer Gene Ther.* **6**, 409–422 (1999).
 149. Gauvrit, A. *et al.* Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response. *Cancer Res.* **68**, 4882–4892 (2008).
 150. Guillerme, J.-B. *et al.* Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Clin. Cancer Res.* **19**, 1147–58 (2013).
 151. Matzinger, P. Tolerance, Danger, and the Extended Family. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 991–1045 (1994).
 152. Pradeu, T. & Cooper, E. L. The danger theory: 20 years later. *Front. Immunol.* **3**, 287 (2012).
 153. Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O. & Zitvogel, L. Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 51–72 (2013).
 154. Ladoire, S. *et al.* Cell-Death-Associated Molecular Patterns As Determinants of Cancer Immunogenicity. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 1098–1116 (2014).
 155. Krysko, D. V. *et al.* Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 860–875 (2012).
 156. Trombetta, E. S. & Mellman, I. CELL BIOLOGY OF ANTIGEN PROCESSING IN VITRO AND IN VIVO. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 975–1028 (2005).
 157. Steinman, R. M., Turley, S., Mellman, I. & Inaba, K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J. Exp. Med.* **191**, 411–6 (2000).
 158. Roncarolo, M. G., Leving, M. K. & Traversari, C. Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. *J. Exp. Med.* **193**, F5-9 (2001).
 159. Dhodapkar, M. V., Steinman, R. M., Krasovskiy, J., Munz, C. & Bhardwaj, N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J. Exp. Med.* **193**, 233–8 (2001).
 160. McWilliam, A. S., Nelson, D., Thomas, J. A. & Holt, P. G. Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. *J. Exp. Med.* **179**, 1331–6 (1994).
 161. Rollins, B. J. Chemokines. *Blood* **90**, 909–28 (1997).
 162. Guermontprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C. & Amigorena, S. ANTIGEN PRESENTATION AND T CELL STIMULATION BY DENDRITIC CELLS. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 621–667 (2002).
 163. Benvenuti, F. *et al.* Dendritic cell maturation controls adhesion, synapse formation, and the duration of the interactions with naive T lymphocytes. *J. Immunol.* **172**, 292–301 (2004).
 164. Satthaporn, S. & Eremin, O. Dendritic cells (I): Biological functions. *J. R. Coll. Surg. Edinb.* **46**, 9–19 (2001).
 165. Hansson, M. *et al.* Dendritic cells express CCR7 and migrate in response to CCL19 (MIP-3 β) after exposure to *Helicobacter pylori*. *Microbes Infect.* **8**, 841–850 (2006).
 166. Neefjes, J., Jongstra, M. L. M., Paul, P. & Bakke, O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 823–836 (2011).
 167. Crotzer, V. L. & Blum, J. S. Autophagy and adaptive immunity. *Immunology* **131**, 9–17 (2010).
 168. Münz, C. Autophagy Beyond Intracellular MHC Class II Antigen Presentation. *Trends Immunol.* **37**, 755–763 (2016).
 169. Zeng, G. *et al.* Identification of CD4+ T cell epitopes from NY-ESO-1 presented by HLA-DR molecules. *J.*

- Immunol.* **165**, 1153–9 (2000).
170. Sharma, P., Wagner, K., Wolchok, J. D. & Allison, J. P. Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 805–12 (2011).
 171. Bouchet, J. & Alcover, A. La synapse immunologique. *Médecine Sci. M/Ssciences* **30**, 665–70 (2014).
 172. Huppa, J. B. & Davis, M. M. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 973–983 (2003).
 173. Curtsinger, J. M. & Mescher, M. F. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 333–40 (2010).
 174. Bonilla, F. A. & Oettgen, H. C. Adaptive immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S33–S40 (2010).
 175. Mittrücker, H.-W., Visekruna, A. & Huber, M. Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8+ T Cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. **62**, 449–458 (2014).
 176. Schumacher, A. & Zenclussen, A. C. Regulatory T Cells: Regulators of Life. *Am. J. Reprod. Immunol.* **72**, 158–170 (2014).
 177. Takeuchi, A. & Saito, T. CD4 CTL, a Cytotoxic Subset of CD4+ T Cells, Their Differentiation and Function. *Front. Immunol.* **8**, 194 (2017).
 178. Andersen, M. H., Schrama, D., thor Straten, P. & Becker, J. C. Cytotoxic T Cells. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 32–41 (2006).
 179. Voskoboinik, I., Whisstock, J. C. & Trapani, J. A. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 388–400 (2015).
 180. Gonzalez, F. & Ashkenazi, A. New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene* **29**, 4752–4765 (2010).
 181. Kalb, M. L., Glaser, A., Stary, G., Koszik, F. & Stingl, G. TRAIL+ Human Plasmacytoid Dendritic Cells Kill Tumor Cells In Vitro: Mechanisms of Imiquimod- and IFN- γ -Mediated Antitumor Reactivity. *J. Immunol.* **188**, 1583–1591 (2012).
 182. Johnstone, R. W., Frew, A. J. & Smyth, M. J. The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 782–798 (2008).
 183. Ahn, S. G., Jeong, J., Hong, S. & Jung, W. H. Current Issues and Clinical Evidence in Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer. *J. Pathol. Transl. Med.* **49**, 355–363 (2015).
 184. Galon, J. *et al.* Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science (80-.)*. **313**, 1960–1964 (2006).
 185. Nakano, O. *et al.* Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res.* **61**, 5132–6 (2001).
 186. Zhang, L. *et al.* Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer. *N. Engl. J. Med.* **348**, 203–213 (2003).
 187. Mihm, M. C., Clemente, C. G. & Cascinelli, N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab. Invest.* **74**, 43–7 (1996).
 188. Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., van der Bruggen, P. & Boon, T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 135–146 (2014).
 189. Scanlan, M. J., Simpson, A. J. G. & Old, L. J. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun.* **4**, 1 (2004).
 190. Chen, Y. T. *et al.* A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 1914–8 (1997).
 191. Jäger, E. *et al.* Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J. Exp. Med.* **187**, 265–70 (1998).
 192. Gnjatic, S. *et al.* in *Advances in cancer research* **95**, 1–30 (2006).
 193. Fonteneau, J. F., Brilot, F., Münz, C. & Gannagé, M. The Tumor Antigen NY-ESO-1 Mediates Direct Recognition of Melanoma Cells by CD4+ T Cells after Intercellular Antigen Transfer. *J. Immunol.* **196**, 64–71 (2016).
 194. Vigneron, N. Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy. *Biomed Res. Int.* **2015**, 1–17 (2015).
 195. Diaconu, I. *et al.* Immune Response Is an Important Aspect of the Antitumor Effect Produced by a CD40L- Encoding Oncolytic Adenovirus. *Cancer Res.* **72**, 2327–2338 (2012).
 196. Miyamoto, S. *et al.* Coxsackievirus B3 Is an Oncolytic Virus with Immunostimulatory Properties That Is Active against Lung Adenocarcinoma. *Cancer Res.* **72**, 2609–2621 (2012).
 197. Takasu, A. *et al.* Immunogenic cell death by oncolytic herpes simplex virus type 1 in squamous cell

- carcinoma cells. *Cancer Gene Ther.* **23**, 107–113 (2016).
198. Donnelly, O. G. *et al.* Measles virus causes immunogenic cell death in human melanoma. *Gene Ther.* **20**, 7–15 (2013).
 199. Breitbach, C. J., Lichty, B. D. & Bell, J. C. Oncolytic Viruses: Therapeutics With an Identity Crisis. *EBioMedicine* **9**, 31–36 (2016).
 200. Achard, C. *et al.* Oncolytic measles virus induces tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated cytotoxicity by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Oncoimmunology* **6**, e1261240 (2017).
 201. Senzer, N. N. *et al.* Phase II Clinical Trial of a Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor–Encoding, Second-Generation Oncolytic Herpesvirus in Patients With Unresectable Metastatic Melanoma. *J. Clin. Oncol.* **27**, 5763–5771 (2009).
 202. Galanis, E. *et al.* Oncolytic Measles Virus Expressing the Sodium Iodide Symporter to Treat Drug-Resistant Ovarian Cancer. *Cancer Res.* **75**, 22–30 (2015).
 203. Ribas, A. *et al.* Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy. *Cell* **170**, 1109–1119.e10 (2017).
 204. Puzanov, I. *et al.* Talimogene Laherparepvec in Combination With Ipilimumab in Previously Untreated, Unresectable Stage IIIB–IV Melanoma. *J. Clin. Oncol.* **34**, 2619–2626 (2016).
 205. Hamid, O., Hoffner, B., Gasal, E., Hong, J. & Carvajal, R. D. Oncolytic immunotherapy: unlocking the potential of viruses to help target cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **66**, 1249–1264 (2017).
 206. Cattaneo, R., Miest, T., Shashkova, E. V. & Barry, M. A. Reprogrammed viruses as cancer therapeutics: targeted, armed and shielded. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 529–540 (2008).
 207. Aref, S., Bailey, K. & Fielding, A. Measles to the Rescue: A Review of Oncolytic Measles Virus. *Viruses* **8**, (2016).
 208. Delpeut, S., Noyce, R. S., Siu, R. W. & Richardson, C. D. Host factors and measles virus replication. *Curr. Opin. Virol.* **2**, 773–783 (2012).
 209. Jiang, Y., Qin, Y. & Chen, M. Host-Pathogen Interactions in Measles Virus Replication and Anti-Viral Immunity. *Viruses* **8**, (2016).
 210. El Najjar, F., Schmitt, A. P. & Dutch, R. E. Paramyxovirus glycoprotein incorporation, assembly and budding: a three way dance for infectious particle production. *Viruses* **6**, 3019–54 (2014).
 211. Brindley, M. A., Takeda, M., Plattet, P. & Plemper, R. K. Triggering the measles virus membrane fusion machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E3018–27 (2012).
 212. Noton, S. L. & Fearn, R. Initiation and regulation of paramyxovirus transcription and replication. *Virology* **479–480**, 545–554 (2015).
 213. Harrison, M. S., Sakaguchi, T. & Schmitt, A. P. Paramyxovirus assembly and budding: Building particles that transmit infections. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 1416–1429 (2010).
 214. Lemon, K. *et al.* Early Target Cells of Measles Virus after Aerosol Infection of Non-Human Primates. *PLoS Pathog.* **7**, e1001263 (2011).
 215. Naim, H. Y. Measles virus: A pathogen, vaccine, and a vector. *Hum. Vaccin. Immunother.* **11**, 21 (2015).
 216. Rota, P. A. *et al.* Measles. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2**, 16049 (2016).
 217. Anlar, B. Subacute sclerosing panencephalitis and chronic viral encephalitis. *Handb. Clin. Neurol.* **112**, 1183–1189 (2013).
 218. Buchanan, R. & Bonthius, D. J. Measles Virus and Associated Central Nervous System Sequelae. *Semin. Pediatr. Neurol.* **19**, 107–114 (2012).
 219. Ehrenguber, M. U., Ehler, E., Billeter, M. A. & Naim, H. Y. Measles virus spreads in rat hippocampal neurons by cell-to-cell contact and in a polarized fashion. *J. Virol.* **76**, 5720–8 (2002).
 220. Yanagi, Y., Tatsuo, H., Ono, N. & Tanaka, K. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* **406**, 893–897 (2000).
 221. Mühlebach, M. D. *et al.* Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature* **480**, 530–533 (2011).
 222. Noyce, R. S. *et al.* Tumor Cell Marker PVRL4 (Nectin 4) Is an Epithelial Cell Receptor for Measles Virus. *PLoS Pathog.* **7**, e1002240 (2011).
 223. Cocks, B. G. *et al.* A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* **376**, 260–263 (1995).
 224. Kruse, M. *et al.* Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on mature CD83+ dendritic cells and is up-regulated by IL-1 beta. *J. Immunol.* **167**, 1989–95 (2001).
 225. Punnonen, J. *et al.* Soluble and membrane-bound forms of signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) induce proliferation and Ig synthesis by activated human B lymphocytes. *J. Exp. Med.* **185**, 993–1004 (1997).

226. Ferreira, C. S. A. *et al.* Measles Virus Infection of Alveolar Macrophages and Dendritic Cells Precedes Spread to Lymphatic Organs in Transgenic Mice Expressing Human Signaling Lymphocytic Activation Molecule (SLAM, CD150). *J. Virol.* **84**, 3033–3042 (2010).
227. de Vries, R. D., Mesman, A. W., Geijtenbeek, T. B., Duprex, W. P. & de Swart, R. L. The pathogenesis of measles. *Curr. Opin. Virol.* **2**, 248–255 (2012).
228. Leonard, V. H. J. *et al.* Measles virus blind to its epithelial cell receptor remains virulent in rhesus monkeys but cannot cross the airway epithelium and is not shed. *J. Clin. Invest.* **118**, 2448–58 (2008).
229. Singh, B. K. *et al.* Cell-to-Cell Contact and Nectin-4 Govern Spread of Measles Virus from Primary Human Myeloid Cells to Primary Human Airway Epithelial Cells. *J. Virol.* **90**, 6808–6817 (2016).
230. Sato, Y. *et al.* Cell-to-Cell Measles Virus Spread between Human Neurons Is Dependent on Hemagglutinin and Hyperfusogenic Fusion Protein. *J. Virol.* **92**, e02166-17 (2018).
231. Patterson, J. B., Thomas, D., Lewicki, H., Billeter, M. A. & Oldstone, M. B. A. V and C Proteins of Measles Virus Function as Virulence Factors in Vivo. *Virology* **267**, 80–89 (2000).
232. Fontana, J. M., Bankamp, B., Bellini, W. J. & Rota, P. A. Regulation of interferon signaling by the C and V proteins from attenuated and wild-type strains of measles virus. *Virology* **374**, 71–81 (2008).
233. Takeuchi, K., Kadota, S., Takeda, M., Miyajima, N. & Nagata, K. Measles virus V protein blocks interferon (IFN)-alpha/beta but not IFN-gamma signaling by inhibiting STAT1 and STAT2 phosphorylation. *FEBS Lett.* **545**, 177–82 (2003).
234. Palosaari, H., Parisien, J.-P., Rodriguez, J. J., Ulane, C. M. & Horvath, C. M. STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. *J. Virol.* **77**, 7635–44 (2003).
235. Sparrer, K. M. J., Pfaller, C. K. & Conzelmann, K.-K. Measles virus C protein interferes with Beta interferon transcription in the nucleus. *J. Virol.* **86**, 796–805 (2012).
236. Shaffer, J. A., Bellini, W. J. & Rota, P. A. The C protein of measles virus inhibits the type I interferon response. *Virology* **315**, 389–397 (2003).
237. Valsamakis, A. *et al.* Recombinant measles viruses with mutations in the C, V, or F gene have altered growth phenotypes in vivo. *J. Virol.* **72**, 7754–61 (1998).
238. Escoffier, C. *et al.* Nonstructural C protein is required for efficient measles virus replication in human peripheral blood cells. *J. Virol.* **73**, 1695–8 (1999).
239. Tober, C. *et al.* Expression of measles virus V protein is associated with pathogenicity and control of viral RNA synthesis. *J. Virol.* **72**, 8124–32 (1998).
240. Reutter, G. L., Cortese-Grogan, C., Wilson, J. & Moyer, S. A. Mutations in the Measles Virus C Protein That Up Regulate Viral RNA Synthesis. *Virology* **285**, 100–109 (2001).
241. Takeuchi, K. *et al.* Stringent Requirement for the C Protein of Wild-Type Measles Virus for Growth both In Vitro and in Macaques. *J. Virol.* **79**, 7838–7844 (2005).
242. Komune, N., Ichinohe, T., Ito, M. & Yanagi, Y. Measles virus V protein inhibits NLRP3 inflammasome-mediated interleukin-1 β secretion. *J. Virol.* **85**, 13019–26 (2011).
243. ENDERS, J. F. & PEEBLES, T. C. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **86**, 277–86 (1954).
244. MEYER, H. M. *et al.* RESPONSE OF VOLTA CHILDREN TO LIVE ATTENUATED MEASLES VIRUS VACCINE. *Bull. World Health Organ.* **30**, 769–81 (1964).
245. Bankamp, B., Takeda, M., Zhang, Y., Xu, W. & Rota, P. A. Genetic Characterization of Measles Vaccine Strains. *J. Infect. Dis.* **204**, S533–S548 (2011).
246. Parks, C. L. *et al.* Comparison of predicted amino acid sequences of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage. *J. Virol.* **75**, 910–20 (2001).
247. Hsu, E. C. *et al.* A single amino acid change in the hemagglutinin protein of measles virus determines its ability to bind CD46 and reveals another receptor on marmoset B cells. *J. Virol.* **72**, 2905–16 (1998).
248. Plattet, P., Alves, L., Herren, M. & Aguilar, H. C. Measles Virus Fusion Protein: Structure, Function and Inhibition. *Viruses* **8**, 112 (2016).
249. Plemper, R. K. & Hammond, A. L. Synergizing vaccinations with therapeutics for measles eradication. *Expert Opin. Drug Discov.* **9**, 201–14 (2014).
250. Vaccine Safety Committe, I. of M. *Adverse Events Associated with Childhood Vaccines*. (National Academies Press, 1994). doi:10.17226/2138
251. Hashiguchi, T. *et al.* Crystal structure of measles virus hemagglutinin provides insight into effective vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 19535–40 (2007).
252. Russell, S. J. *et al.* Remission of disseminated cancer after systemic oncolytic virotherapy. *Mayo Clin. Proc.* **89**, 926–33 (2014).
253. Dörig, R. E., Marcil, A., Chopra, A. & Richardson, C. D. The human CD46 molecule is a receptor for measles

- virus (Edmonston strain). *Cell* **75**, 295–305 (1993).
254. Riley-Vargas, R. C., Gill, D. B., Kemper, C., Liszewski, M. K. & Atkinson, J. P. CD46: expanding beyond complement regulation. *Trends Immunol.* **25**, 496–503 (2004).
 255. Anderson, B. D., Nakamura, T., Russell, S. J. & Peng, K.-W. High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus. *Cancer Res.* **64**, 4919–26 (2004).
 256. Achard, C. *et al.* Sensitivity of human pleural mesothelioma to oncolytic measles virus depends on defects of the type I interferon response. *Oncotarget* **6**, 44892–904 (2015).
 257. Berchtold, S. *et al.* Innate Immune Defense Defines Susceptibility of Sarcoma Cells to Measles Vaccine Virus-Based Oncolysis. *J. Virol.* **87**, 3484–3501 (2013).
 258. DeRycke, M. S. *et al.* Nectin 4 Overexpression in Ovarian Cancer Tissues and Serum. *Am. J. Clin. Pathol.* **134**, 835–845 (2010).
 259. Fabre-Lafay, S. *et al.* Nectin-4, a New Serological Breast Cancer Marker, Is a Substrate for Tumor Necrosis Factor- α -converting Enzyme (TACE)/ADAM-17. *J. Biol. Chem.* **280**, 19543–19550 (2005).
 260. Takano, A. *et al.* Identification of Nectin-4 Oncoprotein as a Diagnostic and Therapeutic Target for Lung Cancer. *Cancer Res.* **69**, 6694–6703 (2009).
 261. Cyrklaff, M. *et al.* Cryo-electron tomography of vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 2772–2777 (2005).
 262. Fenner, F. The eradication of smallpox. *Prog. Med. Virol.* **23**, 1–21 (1977).
 263. Wilkinson, L. Jenner's smallpox vaccine. The riddle of vaccinia virus and its origin. *Med. Hist.* **26**, 94 (1982).
 264. Downie, A. W. The Immunological Relationship of the Virus of Spontaneous Cowpox to Vaccinia Virus. *Br. J. Exp. Pathol.* **20**, 158 (1939).
 265. Halsell, J. S. *et al.* Myopericarditis Following Smallpox Vaccination Among Vaccinia-Naive US Military Personnel. *JAMA* **289**, 3283 (2003).
 266. Kirn, D. H. & Thorne, S. H. Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 64–71 (2009).
 267. Carter, G. C., Law, M., Hollinshead, M. & Smith, G. L. Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. *J. Gen. Virol.* **86**, 1279–1290 (2005).
 268. Chung, C. S., Hsiao, J. C., Chang, Y. S. & Chang, W. A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* **72**, 1577–85 (1998).
 269. Senkevich, T. G., Ojeda, S., Townsley, A., Nelson, G. E. & Moss, B. Poxvirus multiprotein entry-fusion complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 18572–18577 (2005).
 270. Schramm, B. & Locker, J. K. Cytoplasmic Organization of POXvirus DNA Replication. *Traffic* **6**, 839–846 (2005).
 271. Roberts, K. L. & Smith, G. L. Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Trends Microbiol.* **16**, 472–479 (2008).
 272. Sánchez-Sampedro, L. *et al.* The Evolution of Poxvirus Vaccines. *Viruses* **7**, 1726–1803 (2015).
 273. Hochstein-Mintzel, V., Hänichen, T., Huber, H. C. & Stickl, H. [An attenuated strain of vaccinia virus (MVA). Successful intramuscular immunization against vaccinia and variola (author's transl)]. *Zentralbl. Bakteriol. Orig. A.* **230**, 283–97 (1975).
 274. Meyer, H., Sutter, G. & Mayr, A. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J. Gen. Virol.* **72**, 1031–1038 (1991).
 275. Boukhebz, H., Bellon, N., Limacher, J. M. & Inchauspé, G. Therapeutic vaccination to treat chronic infectious diseases. *Hum. Vaccin. Immunother.* **8**, 1746–1757 (2012).
 276. Gilbert, S. C. Clinical development of Modified Vaccinia virus Ankara vaccines. *Vaccine* **31**, 4241–4246 (2013).
 277. Gómez, C. E., Nájera, J. L., Krupa, M., Perdiguero, B. & Esteban, M. MVA and NYVAC as vaccines against emergent infectious diseases and cancer. *Curr. Gene Ther.* **11**, 189–217 (2011).
 278. Goebel, S. J. *et al.* The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology* **179**, 247–266 (1990).
 279. Tartaglia, J. *et al.* NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology* **188**, 217–32 (1992).
 280. Moss, B. Poxvirus entry and membrane fusion. *Virology* **344**, 48–54 (2006).
 281. Broyles, S. S. Vaccinia virus transcription. *J. Gen. Virol.* **84**, 2293–2303 (2003).
 282. Mallardo, M. *et al.* Relationship between vaccinia virus intracellular cores, early mRNAs, and DNA replication sites. *J. Virol.* **76**, 5167–83 (2002).
 283. Kirn, D. H., Wang, Y., Liang, W., Contag, C. H. & Thorne, S. H. Enhancing Poxvirus Oncolytic Effects through Increased Spread and Immune Evasion. *Cancer Res.* **68**, 2071–2075 (2008).
 284. Vanderplasschen, A., Mathew, E., Hollinshead, M., Sim, R. B. & Smith, G. L. Extracellular enveloped vaccinia virus is resistant to complement because of incorporation of host complement control proteins into its envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 7544–9 (1998).

285. Heo, J. *et al.* Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer. *Nat. Med.* **19**, 329–36 (2013).
286. Kelly, K. J. *et al.* Novel Oncolytic Agent GLV-1h68 Is Effective Against Malignant Pleural Mesothelioma. *Hum. Gene Ther.* **19**, 774–782 (2008).
287. Haddad, D. *et al.* A Novel Genetically Modified Oncolytic Vaccinia Virus in Experimental Models is Effective Against a Wide Range of Human Cancers. *Ann. Surg. Oncol.* **19**, 665–674 (2012).
288. Kim, J. H. *et al.* Systemic Armed Oncolytic and Immunologic Therapy for Cancer with JX-594, a Targeted Poxvirus Expressing GM-CSF. *Mol. Ther.* **14**, 361–370 (2006).
289. Heinrich, B. *et al.* Immunogenicity of oncolytic vaccinia viruses JX-GFP and TG6002 in a human melanoma in vitro model: studying immunogenic cell death, dendritic cell maturation and interaction with cytotoxic T lymphocytes. *Onco. Targets. Ther.* **Volume 10**, 2389–2401 (2017).
290. Buller, R. M., Chakrabarti, S., Cooper, J. A., Twardzik, D. R. & Moss, B. Deletion of the vaccinia virus growth factor gene reduces virus virulence. *J. Virol.* **62**, 866–74 (1988).
291. Thorne, S. H. *et al.* Rational strain selection and engineering creates a broad-spectrum, systemically effective oncolytic poxvirus, JX-963. *J. Clin. Invest.* **117**, 3350–8 (2007).
292. White, S. D. & Jacobs, B. L. The Amino Terminus of the Vaccinia Virus E3 Protein Is Necessary To Inhibit the Interferon Response. *J. Virol.* **86**, 5895–5904 (2012).
293. Shors, T. *et al.* Complementation of Vaccinia Virus Deleted of the E3L Gene by Mutants of E3L. *Virology* **239**, 269–276 (1997).
294. Koval, O. *et al.* Recombinant Vaccinia Viruses Coding Transgenes of Apoptosis-Inducing Proteins Enhance Apoptosis But Not Immunogenicity of Infected Tumor Cells. *Biomed Res. Int.* **2017**, 3620510 (2017).
295. Ge, P. *et al.* Cryo-EM Model of the Bullet-Shaped Vesicular Stomatitis Virus. *Science (80-.).* **327**, 689–693 (2010).
296. Hastie, E., Cataldi, M., Marriott, I. & Grdzlishvili, V. Z. Understanding and altering cell tropism of vesicular stomatitis virus. *Virus Res.* **176**, 16–32 (2013).
297. Coil, D. A. & Miller, A. D. Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* **78**, 10920–6 (2004).
298. Finkelshtein, D., Werman, A., Novick, D., Barak, S. & Rubinstein, M. LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 7306–7311 (2013).
299. Lichty, B. D., McBride, H., Hanson, S. & Bell, J. C. Matrix protein of Vesicular stomatitis virus harbours a cryptic mitochondrial-targeting motif. *J. Gen. Virol.* **87**, 3379–3384 (2006).
300. Rajani, K. R. *et al.* Complexes of Vesicular Stomatitis Virus Matrix Protein with Host Rae1 and Nup98 Involved in Inhibition of Host Transcription. *PLoS Pathog.* **8**, e1002929 (2012).
301. Redondo, N., Madan, V., Alvarez, E. & Carrasco, L. Impact of Vesicular Stomatitis Virus M Proteins on Different Cellular Functions. *PLoS One* **10**, e0131137 (2015).
302. Terstegen, L. *et al.* The vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits glycoprotein 130-dependent STAT activation. *J. Immunol.* **167**, 5209–16 (2001).
303. Roberts, A. *et al.* Vaccination with a recombinant vesicular stomatitis virus expressing an influenza virus hemagglutinin provides complete protection from influenza virus challenge. *J. Virol.* **72**, 4704–11 (1998).
304. Schlereth, B. *et al.* Successful mucosal immunization of cotton rats in the presence of measles virus-specific antibodies depends on degree of attenuation of vaccine vector and virus dose. *J. Gen. Virol.* **84**, 2145–2151 (2003).
305. Matsuura, Y. *et al.* Characterization of Pseudotype VSV Possessing HCV Envelope Proteins. *Virology* **286**, 263–275 (2001).
306. Haglund, K., Forman, J., Kräusslich, H.-G. & Rose, J. K. Expression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Protein Precursor and Envelope Proteins from a Vesicular Stomatitis Virus Recombinant: High-Level Production of Virus-like Particles Containing HIV Envelope. doi:10.1006/viro.1999.0120
307. Marzi, A. *et al.* Efficacy of Vesicular Stomatitis Virus–Ebola Virus Postexposure Treatment in Rhesus Macaques Infected With Ebola Virus Makona. *J. Infect. Dis.* **214**, S360–S366 (2016).
308. Black, B. L., Rhodes, R. B., McKenzie, M. & Lyles, D. S. The role of vesicular stomatitis virus matrix protein in inhibition of host-directed gene expression is genetically separable from its function in virus assembly. *J. Virol.* **67**, 4814–21 (1993).
309. Coulon, P. *et al.* Genetic evidence for multiple functions of the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *J. Gen. Virol.* **71**, 991–996 (1990).
310. Janelle, V., Brassard, F., Lapierre, P., Lamarre, A. & Poliquin, L. Mutations in the glycoprotein of vesicular stomatitis virus affect cytopathogenicity: potential for oncolytic virotherapy. *J. Virol.* **85**, 6513–20 (2011).
311. Jenks, N. *et al.* Safety studies on intrahepatic or intratumoral injection of oncolytic vesicular stomatitis

- virus expressing interferon-beta in rodents and nonhuman primates. *Hum. Gene Ther.* **21**, 451–62 (2010).
312. Obuchi, M., Fernandez, M. & Barber, G. N. Development of recombinant vesicular stomatitis viruses that exploit defects in host defense to augment specific oncolytic activity. *J. Virol.* **77**, 8843–56 (2003).
313. Saloura, V. *et al.* Evaluation of an attenuated vesicular stomatitis virus vector expressing interferon-beta for use in malignant pleural mesothelioma: heterogeneity in interferon responsiveness defines potential efficacy. *Hum. Gene Ther.* **21**, 51–64 (2010).
314. Edge, R. E. *et al.* A let-7 MicroRNA-sensitive Vesicular Stomatitis Virus Demonstrates Tumor-specific Replication. *Mol. Ther.* **16**, 1437–1443 (2008).
315. Kelly, E. J., Nace, R., Barber, G. N. & Russell, S. J. Attenuation of vesicular stomatitis virus encephalitis through microRNA targeting. *J. Virol.* **84**, 1550–62 (2010).
316. Lichty, B. D., Power, A. T., Stojdl, D. F. & Bell, J. C. Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. *Trends Mol. Med.* **10**, 210–216 (2004).
317. Bell, J. C. *et al.* Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat. Med.* **6**, 821–825 (2000).
318. Stojdl, D. F. *et al.* VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* **4**, 263–75 (2003).
319. Cary, Z. D., Willingham, M. C. & Lyles, D. S. Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus Induces Apoptosis in U87 Glioblastoma Cells by a Type II Death Receptor Mechanism and Induces Cell Death and Tumor Clearance In Vivo. *J. Virol.* **85**, 5708–5717 (2011).
320. Gaddy, D. F. & Lyles, D. S. Vesicular stomatitis viruses expressing wild-type or mutant M proteins activate apoptosis through distinct pathways. *J. Virol.* **79**, 4170–9 (2005).
321. Kukhanova, M. K., Korovina, A. N. & Kochetkov, S. N. Human herpes simplex virus: Life cycle and development of inhibitors. *Biochem.* **79**, 1635–1652 (2014).
322. Macdonald, S. J., Mostafa, H. H., Morrison, L. A. & Davido, D. J. Genome sequence of herpes simplex virus 1 strain KOS. *J. Virol.* **86**, 6371–2 (2012).
323. Whitley, R. J. & Roizman, B. Herpes simplex virus infections. *Lancet* **357**, 1513–1518 (2001).
324. Aranda, A. M. & Epstein, A. L. Latence et réactivation du virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1). *médecine/sciences* **31**, 506–514 (2015).
325. Saha, D., Wakimoto, H. & Rabkin, S. D. Oncolytic herpes simplex virus interactions with the host immune system. *Curr. Opin. Virol.* **21**, 26–34 (2016).
326. Hengstschläger, M., Pfeilstöcker, M. & Wawra, E. in 455–460 (Springer, Boston, MA, 1998). doi:10.1007/978-1-4615-5381-6_90
327. Aghi, M., Visted, T., DePinho, R. A. & Chiocca, E. A. Oncolytic herpes virus with defective ICP6 specifically replicates in quiescent cells with homozygous genetic mutations in p16. *Oncogene* **27**, 4249–4254 (2008).
328. Li, Y. *et al.* ICP34.5 Protein of Herpes Simplex Virus Facilitates the Initiation of Protein Translation by Bridging Eukaryotic Initiation Factor 2 α (eIF2 α) and Protein Phosphatase 1. *J. Biol. Chem.* **286**, 24785–24792 (2011).
329. Goldsmith, K., Chen, W., Johnson, D. C. & Hendricks, R. L. Infected cell protein (ICP)47 enhances herpes simplex virus neurovirulence by blocking the CD8+ T cell response. *J. Exp. Med.* **187**, 341–8 (1998).
330. Ott, P. A. & Hodi, F. S. Talimogene Laherparepvec for the Treatment of Advanced Melanoma. *Clin. Cancer Res.* **22**, 3127–31 (2016).
331. Bennett, J. J. *et al.* Comparison of safety, delivery and efficacy of two oncolytic herpes viruses (G207 and NV1020) for peritoneal cancer. *Cancer Gene Ther.* **9**, 935–945 (2002).
332. Kambara, H., Okano, H., Chiocca, E. A. & Saeki, Y. An Oncolytic HSV-1 Mutant Expressing ICP34.5 under Control of a Nestin Promoter Increases Survival of Animals even when Symptomatic from a Brain Tumor. *Cancer Res.* **65**, 2832–2839 (2005).
333. Babiker, H. M., Riaz, I. Bin, Husnain, M. & Borad, M. J. Oncolytic virotherapy including Rigvir and standard therapies in malignant melanoma. *Oncolytic virotherapy* **6**, 11–18 (2017).
334. Nemerow, G. R., Pache, L., Reddy, V. & Stewart, P. L. Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies. *Virology* **384**, 380–8 (2009).
335. Nemerow, G. & Stewart, P. Insights into Adenovirus Uncoating from Interactions with Integrins and Mediators of Host Immunity. *Viruses* **8**, 337 (2016).
336. Cook, J. & Radke, J. Mechanisms of pathogenesis of emerging adenoviruses. *F1000Research* **6**, 90 (2017).
337. Niemann, J. & Kühnel, F. Oncolytic viruses: adenoviruses. *Virus Genes* **53**, 700–706 (2017).
338. Fujiyuki, T. *et al.* A measles virus selectively blind to signaling lymphocytic activation molecule shows anti-tumor activity against lung cancer cells. *Oncotarget* **6**, 24895–903 (2015).
339. Patel, M. R. *et al.* Measles Vaccine Strains for Virotherapy of Non-Small-Cell Lung Carcinoma. *J. Thorac.*

- Oncol.* **9**, 1101–1110 (2014).
340. Boisgerault, N. *et al.* Natural oncolytic activity of live-attenuated measles virus against human lung and colorectal adenocarcinomas. *Biomed Res. Int.* **2013**, 387362 (2013).
341. Weibel, S. *et al.* Treatment of malignant effusion by oncolytic virotherapy in an experimental subcutaneous xenograft model of lung cancer. *J. Transl. Med.* **11**, 106 (2013).
342. Hofmann, E., Weibel, S. & Szalay, A. A. Combination treatment with oncolytic Vaccinia virus and cyclophosphamide results in synergistic antitumor effects in human lung adenocarcinoma bearing mice. *J. Transl. Med.* **12**, 197 (2014).
343. Lv, C., Su, Q., Liang, Y., Hu, J. & Yuan, S. Oncolytic vaccine virus harbouring the IL-24 gene suppresses the growth of lung cancer by inducing apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **476**, 21–28 (2016).
344. Toyozumi, T. *et al.* Combined Therapy with Chemotherapeutic Agents and Herpes Simplex Virus Type 1 ICP34.5 Mutant (HSV-1716) in Human Non-Small Cell Lung Cancer. *Hum. Gene Ther.* **10**, 3013–3029 (1999).
345. Li, L. *et al.* The targeted inhibitory effects of human amniotic fluid stem cells carrying CXCR4 promoter and DAL-1 on non-small cell lung carcinoma growth. *Gene Ther.* **23**, 214–222 (2016).
346. Sarkioja, M. *et al.* Noninvasive imaging for evaluation of the systemic delivery of capsid-modified adenoviruses in an orthotopic model of advanced lung cancer. *Cancer* **107**, 1578–1588 (2006).
347. Tilgase, A. *et al.* Effect of the oncolytic ECHO-7 virus Rigvir® on the viability of cell lines of human origin in vitro. *J. Cancer* **9**, 1033–1049 (2018).
348. Liu, C., Hasegawa, K., Russell, S. J., Sadelain, M. & Peng, K.-W. Prostate-specific membrane antigen retargeted measles virotherapy for the treatment of prostate cancer. *Prostate* **69**, 1128–1141 (2009).
349. Msaouel, P. *et al.* Engineered measles virus as a novel oncolytic therapy against prostate cancer. *Prostate* **69**, 82–91 (2009).
350. Msaouel, P. *et al.* Noninvasive Imaging and Radiovirotherapy of Prostate Cancer Using an Oncolytic Measles Virus Expressing the Sodium Iodide Symporter. *Mol. Ther.* **17**, 2041–2048 (2009).
351. Gentschev, I. *et al.* Regression of Human Prostate Tumors and Metastases in Nude Mice following Treatment with the Recombinant Oncolytic Vaccinia Virus GLV-1h68. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, 1–11 (2010).
352. Donat, U. *et al.* Preferential Colonization of Metastases by Oncolytic Vaccinia Virus Strain GLV-1h68 in a Human PC-3 Prostate Cancer Model in Nude Mice. *PLoS One* **7**, e45942 (2012).
353. Walker, J. R. *et al.* Local and Systemic Therapy of Human Prostate Adenocarcinoma with the Conditionally Replicating Herpes Simplex Virus Vector G207. *Hum. Gene Ther.* **10**, 2237–2243 (1999).
354. Ahmed, M., Cramer, S. D. & Lyles, D. S. Sensitivity of prostate tumors to wild type and M protein mutant vesicular stomatitis viruses. *Virology* **330**, 34–49 (2004).
355. Jin, F., Xie, Z., Kuo, C. J., Chung, L. W. K. & Hsieh, C.-L. Cotargeting tumor and tumor endothelium effectively inhibits the growth of human prostate cancer in adenovirus-mediated antiangiogenesis and oncolysis combination therapy. *Cancer Gene Ther.* **12**, 257–267 (2005).
356. Reddi, H. V *et al.* Preclinical efficacy of the oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter in iodine non-avid anaplastic thyroid cancer: a novel therapeutic agent allowing noninvasive imaging and radioiodine therapy. *Cancer Gene Ther.* **19**, 659–665 (2012).
357. Lin, S.-F. *et al.* Treatment of anaplastic thyroid carcinoma in vitro with a mutant vaccinia virus. *Surgery* **142**, 976–983 (2007).
358. Lin, S.-F. *et al.* Oncolytic Vaccinia Virotherapy of Anaplastic Thyroid Cancer *in Vivo*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 4403–4407 (2008).
359. Gholami, S. *et al.* Novel therapy for anaplastic thyroid carcinoma cells using an oncolytic vaccinia virus carrying the human sodium iodide symporter. *Surgery* **150**, 1040–1047 (2011).
360. Mundi, N. *et al.* The control of anaplastic thyroid carcinoma cell lines by oncolytic poxviruses. *Virus Res.* **190**, 53–59 (2014).
361. Yu, Z. *et al.* Treatment of aggressive thyroid cancer with an oncolytic herpes virus. *Int. J. Cancer* **112**, 525–532 (2004).
362. Reddi, H. V *et al.* ONYX-411, a conditionally replicative oncolytic adenovirus, induces cell death in anaplastic thyroid carcinoma cell lines and suppresses the growth of xenograft tumors in nude mice. *Cancer Gene Ther.* **15**, 750–757 (2008).
363. Parviainen, S. *et al.* CD40 ligand and tdTomato-armed vaccinia virus for induction of antitumor immune response and tumor imaging. *Gene Ther.* **21**, 195–204 (2014).
364. Potts, K. G. *et al.* Deletion of *F4L* (ribonucleotide reductase) in vaccinia virus produces a selective oncolytic virus and promotes anti-tumor immunity with superior safety in bladder cancer models. *EMBO Mol. Med.* **9**, 638–654 (2017).

365. Kohno, S. *et al.* Herpes simplex virus type 1 mutant HF10 oncolytic viral therapy for bladder cancer. *Urology* **66**, 1116–1121 (2005).
366. Hadaschik, B. A. *et al.* Oncolytic Vesicular Stomatitis Viruses Are Potent Agents for Intravesical Treatment of High-Risk Bladder Cancer. *Cancer Res.* **68**, 4506–4510 (2008).
367. van der Poel, H. G. *et al.* Epidermal growth factor receptor targeting of replication competent adenovirus enhances cytotoxicity in bladder cancer. *J. Urol.* **168**, 266–72 (2002).
368. Penheiter, A. R. *et al.* Sodium Iodide Symporter (NIS)-Mediated Radiovirotherapy for Pancreatic Cancer. *Am. J. Roentgenol.* **195**, 341–349 (2010).
369. Bossow, S. *et al.* Armed and targeted measles virus for chemovirotherapy of pancreatic cancer. *Cancer Gene Ther.* **18**, 598–608 (2011).
370. Awano, M. *et al.* Measles virus selectively blind to signaling lymphocyte activity molecule has oncolytic efficacy against nectin-4-expressing pancreatic cancer cells. *Cancer Sci.* **107**, 1647–1652 (2016).
371. Ellerhoff, T. P. *et al.* Novel epi-virotherapeutic treatment of pancreatic cancer combining the oral histone deacetylase inhibitor resminostat with oncolytic measles vaccine virus. *Int. J. Oncol.* **49**, 1931–1944 (2016).
372. Binz, E. *et al.* Chemovirotherapy of Pancreatic Adenocarcinoma by Combining Oncolytic Vaccinia Virus GLV-1h68 with nab -Paclitaxel Plus Gemcitabine. *Mol. Ther. - Oncolytics* **6**, 10–21 (2017).
373. Spear, M. A. *et al.* Cytotoxicity, apoptosis and viral replication in tumor cells treated with oncolytic ribonucleotide reductase-defective herpes simplex type 1 virus (hrR3) combined with ionizing radiation. *Cancer Gene Ther.* **7**, 1051–1059 (2000).
374. Murphy, A. M. *et al.* Vesicular Stomatitis Virus as an Oncolytic Agent against Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J. Virol.* **86**, 3073–3087 (2012).
375. Bortolanza, S. *et al.* Human Adenovirus Replicates in Immunocompetent Models of Pancreatic Cancer in Syrian Hamsters. *Hum. Gene Ther.* **18**, 681–690 (2007).
376. Jun, K.-H. *et al.* A novel oncolytic viral therapy and imaging technique for gastric cancer using a genetically engineered vaccinia virus carrying the human sodium iodide symporter. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **33**, 2 (2014).
377. Tsuji, T. *et al.* An armed oncolytic herpes simplex virus expressing thrombospondin-1 has an enhanced *in vivo* antitumor effect against human gastric cancer. *Int. J. Cancer* **132**, 485–494 (2013).
378. Kangasniemi, L. *et al.* Infectivity-Enhanced Adenoviruses Deliver Efficacy in Clinical Samples and Orthotopic Models of Disseminated Gastric Cancer. *Clin. Cancer Res.* **12**, 3137–3144 (2006).
379. Haley, E. S., Au, G. G., Carlton, B. R., Barry, R. D. & Shafren, D. R. Regional administration of oncolytic Echovirus 1 as a novel therapy for the peritoneal dissemination of gastric cancer. *J. Mol. Med.* **87**, 385–399 (2009).
380. Li, H., Peng, K.-W. & Russell, S. J. Oncolytic Measles Virus Encoding Thyroidal Sodium Iodide Symporter for Squamous Cell Cancer of the Head and Neck Radiovirotherapy. *Hum. Gene Ther.* **23**, 295–301 (2012).
381. Zaoui, K. *et al.* Chemovirotherapy for head and neck squamous cell carcinoma with EGFR-targeted and CD/UPRT-armed oncolytic measles virus. *Cancer Gene Ther.* **19**, 181–191 (2012).
382. Tysome, J. R. *et al.* Lister Vaccine Strain of Vaccinia Virus Armed with the Endostatin–Angiostatin Fusion Gene: An Oncolytic Virus Superior to dl 1520 (ONYX-015) for Human Head and Neck Cancer. *Hum. Gene Ther.* **22**, 1101–1108 (2011).
383. Mansfield, D. *et al.* Oncolytic Vaccinia virus and radiotherapy in head and neck cancer. *Oral Oncol.* **49**, 108–118 (2013).
384. Nichols, A. C. *et al.* Vaccinia Virus Outperforms a Panel of Other Poxviruses as a Potent Oncolytic Agent for the Control of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. *Intervirology* **57**, 17–22 (2014).
385. Mell, L. K. *et al.* Phase I Trial of Intravenous Oncolytic Vaccinia Virus (GL-ONC1) with Cisplatin and Radiotherapy in Patients with Locoregionally Advanced Head and Neck Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **23**, 5696–5702 (2017).
386. Morris, J. C. & Wildner, O. Therapy of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma with an Oncolytic Adenovirus Expressing HSV-tk. *Mol. Ther.* **1**, 56–62 (2000).
387. Shin, E. J. *et al.* Fusogenic Vesicular Stomatitis Virus for the Treatment of Head and Neck Squamous Carcinomas. *Otolaryngol. Neck Surg.* **136**, 811–817 (2007).
388. Tanaka, H. *et al.* A Replication-Selective Adenoviral Vector for Head and Neck Cancers. *Arch. Otolaryngol. Neck Surg.* **131**, 630 (2005).
389. Goncharova, E. P., Ruzhenkova, J. S., Petrov, I. S., Shchelkunov, S. N. & Zenkova, M. A. Oncolytic virus efficiency inhibited growth of tumour cells with multiple drug resistant phenotype *in vivo* and *in vitro*. *J. Transl. Med.* **14**, 241 (2016).
390. Blank, S. V. *et al.* Replication-Selective Herpes Simplex Virus Type 1 Mutant Therapy of Cervical Cancer Is

- Enhanced by Low-Dose Radiation. *Hum. Gene Ther.* **13**, 627–639 (2002).
391. Le Boeuf, F. *et al.* Sensitivity of cervical carcinoma cells to vesicular stomatitis virus-induced oncolysis: Potential role of human papilloma virus infection. *Int. J. Cancer* **131**, E204–E215 (2012).
392. Bauerschmitz, G. J. *et al.* Evaluation of a selectively oncolytic adenovirus for local and systemic treatment of cervical cancer. *Int. J. Cancer* **111**, 303–309 (2004).
393. Ungerechts, G. *et al.* An Immunocompetent Murine Model for Oncolysis with an Armed and Targeted Measles Virus. *Mol. Ther.* **15**, 1991–1997 (2007).
394. Bach, P. *et al.* Specific Elimination of CD133+ Tumor Cells with Targeted Oncolytic Measles Virus. *Cancer Res.* **73**, 865–874 (2013).
395. Delpue, S., Sisson, G., Black, K. M. & Richardson, C. D. Measles Virus Enters Breast and Colon Cancer Cell Lines through a PVRL4-Mediated Macropinocytosis Pathway. *J. Virol.* **91**, e02191-16 (2017).
396. Foloppe, J. *et al.* Targeted delivery of a suicide gene to human colorectal tumors by a conditionally replicating vaccinia virus. *Gene Ther.* **15**, 1361–1371 (2008).
397. Ehrig, K. *et al.* Growth inhibition of different human colorectal cancer xenografts after a single intravenous injection of oncolytic vaccinia virus GLV-1h68. *J. Transl. Med.* **11**, 79 (2013).
398. Eveno, C. *et al.* Gene therapy using therapeutic and diagnostic recombinant oncolytic vaccinia virus GLV-1h153 for management of colorectal peritoneal carcinomatosis. *Surgery* **157**, 331–337 (2015).
399. Ottolino-Perry, K. *et al.* Oncolytic vaccinia virus synergizes with irinotecan in colorectal cancer. *Mol. Oncol.* **9**, 1539–1552 (2015).
400. Todryk, S. *et al.* Disabled Infectious Single-Cycle Herpes Simplex Virus as an Oncolytic Vector for Immunotherapy of Colorectal Cancer. *Hum. Gene Ther.* **10**, 2757–2768 (1999).
401. Huang, T.-G., Ebert, O., Shinozaki, K., García-Sastre, A. & Woo, S. L. C. Oncolysis of hepatic metastasis of colorectal cancer by recombinant vesicular stomatitis virus in immune-competent mice. *Mol. Ther.* **8**, 434–440 (2003).
402. Li, Y. *et al.* Carcinoembryonic antigen-producing cell-specific oncolytic adenovirus, OV798, for colorectal cancer therapy. *Mol. Cancer Ther.* **2**, 1003–9 (2003).
403. Israelsson, S., Jonsson, N., Gullberg, M. & Lindberg, A. M. Cytolytic replication of echoviruses in colon cancer cell lines. *Viol. J.* **8**, 473 (2011).
404. Muhlebach, M. D. *et al.* Liver Cancer Protease Activity Profiles Support Therapeutic Options with Matrix Metalloproteinase-Activatable Oncolytic Measles Virus. *Cancer Res.* **70**, 7620–7629 (2010).
405. Blechacz, B. *et al.* Engineered measles virus as a novel oncolytic viral therapy system for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **44**, 1465–1477 (2006).
406. Lampe, J. *et al.* An armed oncolytic measles vaccine virus eliminates human hepatoma cells independently of apoptosis. *Gene Ther.* **20**, 1033–1041 (2013).
407. Zimmermann, M. *et al.* Human precision-cut liver tumor slices as a tumor patient-individual predictive test system for oncolytic measles vaccine viruses. *Int. J. Oncol.* **34**, 1247–56 (2009).
408. Gentschev, I. *et al.* Efficient Colonization and Therapy of Human Hepatocellular Carcinoma (HCC) Using the Oncolytic Vaccinia Virus Strain GLV-1h68. *PLoS One* **6**, e22069 (2011).
409. Ady, J. W. *et al.* Oncolytic immunotherapy using recombinant vaccinia virus GLV-1h68 kills sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma efficiently. *Surgery* **156**, 263–269 (2014).
410. Ady, J. W. *et al.* Oncolytic gene therapy with recombinant vaccinia strain GLV-2b372 efficiently kills hepatocellular carcinoma. *Surgery* **158**, 331–338 (2015).
411. Jia, X., Chen, Y., Zhao, X., Lv, C. & Yan, J. Oncolytic vaccinia virus inhibits human hepatocellular carcinoma MHCC97-H cell proliferation via endoplasmic reticulum stress, autophagy and Wnt pathways. *J. Gene Med.* **18**, 211–219 (2016).
412. Heo, J. *et al.* Sequential Therapy With JX-594, A Targeted Oncolytic Poxvirus, Followed by Sorafenib in Hepatocellular Carcinoma: Preclinical and Clinical Demonstration of Combination Efficacy. *Mol. Ther.* **19**, 1170–1179 (2011).
413. Hussein, F. *et al.* Vectorized Gene Therapy of Liver Tumors: Proof of Concept of TG4023 (MVA-FCU1) in Combination with Flucytosine. *Ann. Oncol.* **28**, mdw440 (2016).
414. Carroll, N. M., Chiocca, E. A., Takahashi, K. & Tanabe, K. K. Enhancement of gene therapy specificity for diffuse colon carcinoma liver metastases with recombinant herpes simplex virus. *Ann. Surg.* **224**, 323-9; discussion 329-30 (1996).
415. Shinozaki, K., Ebert, O., Kournioti, C., Tai, Y.-S. & Woo, S. L. . Oncolysis of Multifocal Hepatocellular Carcinoma in the Rat Liver by Hepatic Artery Infusion of Vesicular Stomatitis Virus. *Mol. Ther.* **9**, 368–376 (2004).
416. Kim, J. *et al.* Antitumoral effects of recombinant adenovirus YKL-1001, conditionally replicating in alpha-

- fetoprotein-producing human liver cancer cells. *Cancer Lett.* **180**, 23–32 (2002).
417. McDonald, C. J. *et al.* A measles virus vaccine strain derivative as a novel oncolytic agent against breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **99**, 177–184 (2006).
418. Iankov, I. D. *et al.* Expression of immunomodulatory neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* enhances the antitumor activity of oncolytic measles virus. *Mol. Ther.* **20**, 1139–47 (2012).
419. Sugiyama, T. *et al.* Measles virus selectively blind to signaling lymphocyte activation molecule as a novel oncolytic virus for breast cancer treatment. *Gene Ther.* **20**, 338–347 (2013).
420. Jing, Y. *et al.* Molecular Effects of Stromal-Selective Targeting by uPAR-Retargeted Oncolytic Virus in Breast Cancer. *Mol. Cancer Res.* **15**, 1410–1420 (2017).
421. Zhang, Q. *et al.* Eradication of Solid Human Breast Tumors in Nude Mice with an Intravenously Injected Light-Emitting Oncolytic Vaccinia Virus. *Cancer Res.* **67**, 10038–10046 (2007).
422. Gentschev, I. *et al.* Use of an oncolytic vaccinia virus for the treatment of canine breast cancer in nude mice: preclinical development of a therapeutic agent. *Cancer Gene Ther.* **16**, 320–328 (2009).
423. Seubert, C. M. *et al.* Enhanced tumor therapy using vaccinia virus strain GLV-1h68 in combination with a β -galactosidase-activatable prodrug seco-analog of duocarmycin SA. *Cancer Gene Ther.* **18**, 42–52 (2011).
424. Szalay, E., Grummt, F. & Szalay, A. A. Vaccinia virus GLV-1h237 carrying a Walker A motif mutation of mouse Cdc6 protein enhances human breast tumor therapy in mouse xenografts. *Int. J. Oncol.* **38**, 871–8 (2011).
425. Gholami, S. *et al.* Vaccinia Virus GLV-1h153 Is Effective in Treating and Preventing Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Ann. Surg.* **256**, 437–445 (2012).
426. Wang, H., Chen, N. G., Minev, B. R. & Szalay, A. A. Oncolytic vaccinia virus GLV-1h68 strain shows enhanced replication in human breast cancer stem-like cells in comparison to breast cancer cells. *J. Transl. Med.* **10**, 167 (2012).
427. Gholami, S. *et al.* Vaccinia virus GLV-1h153 is a novel agent for detection and effective local control of positive surgical margins for breast cancer. *Breast Cancer Res.* **15**, R26 (2013).
428. Gholami, S. *et al.* A novel vaccinia virus with dual oncolytic and anti-angiogenic therapeutic effects against triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **148**, 489–499 (2014).
429. Thomas, D. L. & Fraser, N. W. HSV-1 therapy of primary tumors reduces the number of metastases in an immune-competent model of metastatic breast cancer. *Mol. Ther.* **8**, 543–51 (2003).
430. Ebert, O., Harbaran, S., Shinozaki, K. & Woo, S. L. C. Systemic therapy of experimental breast cancer metastases by mutant vesicular stomatitis virus in immune-competent mice. *Cancer Gene Ther.* **12**, 350–358 (2005).
431. Heise, C. *et al.* Erratum: An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic antitumoral efficacy. *Nat. Med.* **6**, 1134–1139 (2000).
432. Peng, K.-W. *et al.* Intraperitoneal therapy of ovarian cancer using an engineered measles virus. *Cancer Res.* **62**, 4656–62 (2002).
433. Hasegawa, K. *et al.* The Use of a Tropism-Modified Measles Virus in Folate Receptor-Targeted Virotherapy of Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res.* **12**, 6170–6178 (2006).
434. Myers, R. *et al.* Oncolytic activities of approved mumps and measles vaccines for therapy of ovarian cancer. *Cancer Gene Ther.* **12**, 593–599 (2005).
435. Iankov, I. D. *et al.* Infected Cell Carriers: A New Strategy for Systemic Delivery of Oncolytic Measles Viruses in Cancer Virotherapy. *Mol. Ther.* **15**, 114–122 (2007).
436. Hasegawa, K. *et al.* Dual Therapy of Ovarian Cancer Using Measles Viruses Expressing Carcinoembryonic Antigen and Sodium Iodide Symporter. *Clin. Cancer Res.* **12**, 1868–1875 (2006).
437. Galanis, E. *et al.* Phase I Trial of Intraperitoneal Administration of an Oncolytic Measles Virus Strain Engineered to Express Carcinoembryonic Antigen for Recurrent Ovarian Cancer. *Cancer Res.* **70**, 875–882 (2010).
438. Hartkopf, A. D. *et al.* Enhanced killing of ovarian carcinoma using oncolytic measles vaccine virus armed with a yeast cytosine deaminase and uracil phosphoribosyltransferase. *Gynecol. Oncol.* **130**, 362–368 (2013).
439. Hung, C.-F. *et al.* Vaccinia virus preferentially infects and controls human and murine ovarian tumors in mice. *Gene Ther.* **14**, 20–29 (2007).
440. Chalikhonda, S. *et al.* Oncolytic virotherapy for ovarian carcinomatosis using a replication-selective vaccinia virus armed with a yeast cytosine deaminase gene. *Cancer Gene Ther.* **15**, 115–125 (2008).
441. Chang, C.-L., Ma, B., Pang, X., Wu, T.-C. & Hung, C.-F. Treatment With Cyclooxygenase-2 Inhibitors Enables Repeated Administration of Vaccinia Virus for Control of Ovarian Cancer. *Mol. Ther.* **17**, 1365–1372 (2009).
442. Whilding, L. M. *et al.* Vaccinia Virus Induces Programmed Necrosis in Ovarian Cancer Cells. *Mol. Ther.* **21**,

- 2074–2086 (2013).
443. Komorowski, M. P. *et al.* Reprogramming antitumor immunity against chemoresistant ovarian cancer by a CXCR4 antagonist-armed viral oncotherapy. *Mol. Ther. - Oncolytics* **3**, 16034 (2016).
444. Coukos, G. *et al.* Multi-attenuated herpes simplex virus-1 mutant G207 exerts cytotoxicity against epithelial ovarian cancer but not normal mesothelium and is suitable for intraperitoneal oncolytic therapy. *Cancer Gene Ther.* **7**, 275–283 (2000).
445. Capo-chichi, C. D. *et al.* Explicit targeting of transformed cells by VSV in ovarian epithelial tumor-bearing Wv mouse models. *Gynecol. Oncol.* **116**, 269–275 (2010).
446. Bauerschmitz, G. J. *et al.* Treatment of ovarian cancer with a tropism modified oncolytic adenovirus. *Cancer Res.* **62**, 1266–70 (2002).
447. Shafren, D. R., Sylvester, D., Johansson, E. S., Campbell, I. G. & Barry, R. D. Oncolysis of human ovarian cancers by echovirus type 1. *Int. J. Cancer* **115**, 320–328 (2005).
448. Meng, X. *et al.* Enhanced antitumor effects of an engineered measles virus Edmonston strain expressing the wild-type N, P, L genes on human renal cell carcinoma. *Mol. Ther.* **18**, 544–51 (2010).
449. Guse, K. *et al.* Antiangiogenic Arming of an Oncolytic Vaccinia Virus Enhances Antitumor Efficacy in Renal Cell Cancer Models. *J. Virol.* **84**, 856–866 (2010).
450. Fend, L. *et al.* Oncolytic virotherapy with an armed vaccinia virus in an orthotopic model of renal carcinoma is associated with modification of the tumor microenvironment. *Oncoimmunology* **5**, e1080414 (2016).
451. Fu, X., Nakamori, M., Tao, L., Amato, R. & Zhang, X. Antitumor effects of two newly constructed oncolytic herpes simplex viruses against renal cell carcinoma. *Int. J. Oncol.* **30**, 1561–7 (2007).
452. Guse, K. *et al.* Treatment of metastatic renal cancer with capsid-modified oncolytic adenoviruses. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 2728–2736 (2007).
453. Leber, M. F. *et al.* MicroRNA-sensitive oncolytic measles viruses for cancer-specific vector tropism. *Mol. Ther.* **19**, 1097–106 (2011).
454. Allen, C. *et al.* Interleukin-13 displaying retargeted oncolytic measles virus strains have significant activity against gliomas with improved specificity. *Mol. Ther.* **16**, 1556–64 (2008).
455. Allen, C. *et al.* Oncolytic measles virus strains have significant antitumor activity against glioma stem cells. *Gene Ther.* **20**, 444–9 (2013).
456. Phuong, L. K. *et al.* Use of a vaccine strain of measles virus genetically engineered to produce carcinoembryonic antigen as a novel therapeutic agent against glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* **63**, 2462–9 (2003).
457. Opyrchal, M. *et al.* Effective Radiovirotherapy for Malignant Gliomas by Using Oncolytic Measles Virus Strains Encoding the Sodium Iodide Symporter (MV-NIS). *Hum. Gene Ther.* **23**, 419–427 (2012).
458. Hardcastle, J. *et al.* Immunovirotherapy with measles virus strains in combination with anti-PD-1 antibody blockade enhances antitumor activity in glioblastoma treatment. *Neuro. Oncol.* **19**, now179 (2016).
459. Timiryasova, T. M. *et al.* Antitumor effect of vaccinia virus in glioma model. *Oncol. Res.* **11**, 133–44 (1999).
460. Lun, X. Q. *et al.* Efficacy of Systemically Administered Oncolytic Vaccinia Virotherapy for Malignant Gliomas Is Enhanced by Combination Therapy with Rapamycin or Cyclophosphamide. *Clin. Cancer Res.* **15**, 2777–2788 (2009).
461. Lun, X. *et al.* Efficacy and Safety/Toxicity Study of Recombinant Vaccinia Virus JX-594 in Two Immunocompetent Animal Models of Glioma. *Mol. Ther.* **18**, 1927–1936 (2010).
462. Advani, S. J. *et al.* Preferential Replication of Systemically Delivered Oncolytic Vaccinia Virus in Focally Irradiated Glioma Xenografts. *Clin. Cancer Res.* **18**, 2579–2590 (2012).
463. Andreansky, S. *et al.* Evaluation of genetically engineered herpes simplex viruses as oncolytic agents for human malignant brain tumors. *Cancer Res.* **57**, 1502–9 (1997).
464. Duntsch, C. D. *et al.* Recombinant vesicular stomatitis virus vectors as oncolytic agents in the treatment of high-grade gliomas in an organotypic brain tissue slice—glioma coculture model. *J. Neurosurg.* **100**, 1049–1059 (2004).
465. Fueyo, J. *et al.* A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene* **19**, 2–12 (2000).
466. Grote, D., Cattaneo, R. & Fielding, A. K. Neutrophils contribute to the measles virus-induced antitumor effect: enhancement by granulocyte macrophage colony-stimulating factor expression. *Cancer Res.* **63**, 6463–8 (2003).
467. Patel, B. *et al.* Differential cytopathology and kinetics of measles oncolysis in two primary B-cell malignancies provides mechanistic insights. *Mol. Ther.* **19**, 1034–40 (2011).
468. Heinzerling, L. *et al.* Oncolytic measles virus in cutaneous T-cell lymphomas mounts antitumor immune responses in vivo and targets interferon-resistant tumor cells. *Blood* **106**, 2287–2294 (2005).

469. Bucheit, A. D. *et al.* An oncolytic measles virus engineered to enter cells through the CD20 antigen. *Mol. Ther.* **7**, 62–72 (2003).
470. Grote, D. *et al.* Live attenuated measles virus induces regression of human lymphoma xenografts in immunodeficient mice. *Blood* **97**, 3746–54 (2001).
471. Ungerechts, G. *et al.* Mantle cell lymphoma salvage regimen: synergy between a reprogrammed oncolytic virus and two chemotherapeutics. *Gene Ther.* **17**, 1506–16 (2010).
472. Lee, N. H. *et al.* Gene expression profiling of hematologic malignant cell lines resistant to oncolytic virus treatment. *Oncotarget* **8**, 1213–1225 (2017).
473. Zhang, X., Zhao, L., Hang, Z., Guo, H. & Zhang, M. Evaluation of HSV-1 and adenovirus vector-mediated infection, replication and cytotoxicity in lymphoma cell lines. *Oncol. Rep.* **26**, 637–44 (2011).
474. Tumilasci, V. F. *et al.* Targeting the Apoptotic Pathway with BCL-2 Inhibitors Sensitizes Primary Chronic Lymphocytic Leukemia Cells to Vesicular Stomatitis Virus-Induced Oncolysis. *J. Virol.* **82**, 8487–8499 (2008).
475. Qian, W. *et al.* Enhanced antitumor activity by a selective conditionally replicating adenovirus combining with MDA-7/interleukin-24 for B-lymphoblastic leukemia via induction of apoptosis. *Leukemia* **22**, 361–369 (2008).
476. Studebaker, A. W. *et al.* Treatment of medulloblastoma with a modified measles virus. *Neuro. Oncol.* **12**, 1034–1042 (2010).
477. Studebaker, A. W. *et al.* Oncolytic measles virus prolongs survival in a murine model of cerebral spinal fluid-disseminated medulloblastoma. *Neuro. Oncol.* **14**, 459–470 (2012).
478. Hutzen, B. *et al.* Treatment of medulloblastoma with oncolytic measles viruses expressing the angiogenesis inhibitors endostatin and angiostatin. *BMC Cancer* **14**, 206 (2014).
479. Stolarek, R. *et al.* Robust infectivity and replication of Delta-24 adenovirus induce cell death in human medulloblastoma. *Cancer Gene Ther.* **11**, 713–720 (2004).
480. Kaufmann, J. K. *et al.* Chemovirotherapy of Malignant Melanoma with a Targeted and Armed Oncolytic Measles Virus. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 1034–1042 (2013).
481. Engeland, C. E. *et al.* CTLA-4 and PD-L1 checkpoint blockade enhances oncolytic measles virus therapy. *Mol. Ther.* **22**, 1949–59 (2014).
482. Allagui, F. *et al.* Modulation of the Type I Interferon Response Defines the Sensitivity of Human Melanoma Cells to Oncolytic Measles Virus. *Curr. Gene Ther.* (2017).
483. Greiner, S. *et al.* The highly attenuated vaccinia virus strain modified virus Ankara induces apoptosis in melanoma cells and allows bystander dendritic cells to generate a potent anti-tumoral immunity. *Clin. Exp. Immunol.* **146**, 344–353 (2006).
484. Kyula, J. N. *et al.* Synergistic cytotoxicity of radiation and oncolytic Lister strain vaccinia in V600D/EBRAF mutant melanoma depends on JNK and TNF- α signaling. *Oncogene* **33**, 1700–1712 (2014).
485. McKee, T. D. *et al.* Degradation of Fibrillar Collagen in a Human Melanoma Xenograft Improves the Efficacy of an Oncolytic Herpes Simplex Virus Vector. *Cancer Res.* **66**, 2509–2513 (2006).
486. Wollmann, G., Davis, J. N., Bosenberg, M. W. & van den Pol, A. N. Vesicular Stomatitis Virus Variants Selectively Infect and Kill Human Melanomas but Not Normal Melanocytes. *J. Virol.* **87**, 6644–6659 (2013).
487. Nettelbeck, D. M., Rivera, A. A., Balagué, C., Alemany, R. & Curiel, D. T. Novel oncolytic adenoviruses targeted to melanoma: specific viral replication and cytolysis by expression of E1A mutants from the tyrosinase enhancer/promoter. *Cancer Res.* **62**, 4663–70 (2002).
488. Li, H., Peng, K.-W., Dingli, D., Kratzke, R. a & Russell, S. J. Oncolytic measles viruses encoding interferon beta and the thyroidal sodium iodide symporter gene for mesothelioma virotherapy. *Cancer Gene Ther.* **17**, 550–558 (2010).
489. Belin, L. J. *et al.* An oncolytic vaccinia virus expressing the human sodium iodine symporter prolongs survival and facilitates SPECT/CT imaging in an orthotopic model of malignant pleural mesothelioma. *Surgery* **154**, 486–495 (2013).
490. Acuna, S. A. *et al.* Oncolytic Vaccinia Virus as an Adjuvant Treatment to Cytoreductive Surgery for Malignant Peritoneal Mesothelioma. *Ann. Surg. Oncol.* **21**, 2259–2266 (2014).
491. Adusumilli, P. S. *et al.* Imaging and therapy of malignant pleural mesothelioma using replication-competent herpes simplex viruses. *J. Gene Med.* **8**, 603–615 (2006).
492. Willmon, C. L. *et al.* Expression of IFN- Enhances Both Efficacy and Safety of Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus for Therapy of Mesothelioma. *Cancer Res.* **69**, 7713–7720 (2009).
493. Zhu, Z. B. *et al.* Targeting mesothelioma using an infectivity enhanced survivin-conditionally replicative adenoviruses. *J. Thorac. Oncol.* **1**, 701–11 (2006).
494. Peng, K. W. *et al.* Systemic therapy of myeloma xenografts by an attenuated measles virus. *Blood* **98**, 2002–

- 7 (2001).
495. Hallak, L. K., Merchan, J. R., Storgard, C. M., Loftus, J. C. & Russell, S. J. Targeted measles virus vector displaying echistatin infects endothelial cells via alpha(v)beta3 and leads to tumor regression. *Cancer Res.* **65**, 5292–300 (2005).
 496. Dingli, D. *et al.* Image-guided radiovirotherapy for multiple myeloma using a recombinant measles virus expressing the thyroidal sodium iodide symporter. *Blood* **103**, 1641–1646 (2004).
 497. Peng, K.-W. *et al.* Oncolytic measles viruses displaying a single-chain antibody against CD38, a myeloma cell marker. *Blood* **101**, 2557–2562 (2003).
 498. Ong, H. T. *et al.* Oncolytic measles virus targets high CD46 expression on multiple myeloma cells. *Exp. Hematol.* **34**, 713–720 (2006).
 499. Hummel, H.-D. *et al.* Genetically engineered attenuated measles virus specifically infects and kills primary multiple myeloma cells. *J. Gen. Virol.* **90**, 693–701 (2009).
 500. Deng, H. *et al.* Oncolytic virotherapy for multiple myeloma using a tumour-specific double-deleted vaccinia virus. *Leukemia* **22**, 2261–2264 (2008).
 501. Lei, W. *et al.* Combined expression of miR-34a and Smac mediated by oncolytic vaccinia virus synergistically promote anti-tumor effects in Multiple Myeloma. *Sci. Rep.* **6**, 32174 (2016).
 502. Kilinc, M. O., Ehrig, K., Pessian, M., Minev, B. R. & Szalay, A. A. Colonization of xenograft tumors by oncolytic vaccinia virus (VACV) results in enhanced tumor killing due to the involvement of myeloid cells. *J. Transl. Med.* **14**, 340 (2016).
 503. Futami, M. *et al.* Efficacy and Safety of Doubly-Regulated Vaccinia Virus in a Mouse Xenograft Model of Multiple Myeloma. *Mol. Ther. - Oncolytics* **6**, 57–68 (2017).
 504. Lichty, B. D. *et al.* Vesicular Stomatitis Virus: A Potential Therapeutic Virus for the Treatment of Hematologic Malignancy. *Hum. Gene Ther.* **15**, 821–831 (2004).
 505. Fernandes, M. S. *et al.* Growth Inhibition of Human Multiple Myeloma Cells by an Oncolytic Adenovirus Carrying the CD40 Ligand Transgene. *Clin. Cancer Res.* **15**, 4847–4856 (2009).
 506. Zhang, S.-C. *et al.* Engineered measles virus Edmonston strain used as a novel oncolytic viral system against human neuroblastoma through a CD46 and nectin 4-independent pathway. *Cancer Lett.* **325**, 227–237 (2012).
 507. Li, H., Dutuor, A., Tao, L., Fu, X. & Zhang, X. Virotherapy with a Type 2 Herpes Simplex Virus-Derived Oncolytic Virus Induces Potent Antitumor Immunity against Neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.* **13**, 316–322 (2007).
 508. Corredor, J. C. *et al.* N-Myc expression enhances the oncolytic effects of vesicular stomatitis virus in human neuroblastoma cells. *Mol. Ther. - Oncolytics* **3**, 16005 (2016).
 509. Georger, B. *et al.* Expression of p53, or targeting towards EGFR, enhances the oncolytic potency of conditionally replicative adenovirus against neuroblastoma. *J. Gene Med.* **7**, 584–594 (2005).
 510. Domingo-Musibay, E. *et al.* Measles Edmonston vaccine strain derivatives have potent oncolytic activity against osteosarcoma. *Cancer Gene Ther.* **21**, 483–490 (2014).
 511. Kubo, T. *et al.* Oncolytic vesicular stomatitis virus administered by isolated limb perfusion suppresses osteosarcoma growth. *J. Orthop. Res.* **29**, 795–800 (2011).
 512. Witlox, A. M. *et al.* Conditionally replicative adenovirus with tropism expanded towards integrins inhibits osteosarcoma tumor growth in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res.* **10**, 61–7 (2004).
 513. Song, X., Yu, F., Gottschalk, S. & Bartlett, D. Arming oncolytic vaccinia virus with T cell engager to improve virus therapy (P4413). *J. Immunol.* **190**, (2013).
 514. Conner, J., Braidwood, L. & Brown, S. M. A strategy for systemic delivery of the oncolytic herpes virus HSV1716: redirected tropism by antibody-binding sites incorporated on the virion surface as a glycoprotein D fusion protein. *Gene Ther.* **15**, 1579–1592 (2008).
 515. Friedman, G. K. *et al.* Engineered herpes simplex viruses efficiently infect and kill CD133+ human glioma xenograft cells that express CD111. *J. Neurooncol.* **95**, 199–209 (2009).
 516. Ulasov, I. V. *et al.* Targeting adenovirus to CD80 and CD86 receptors increases gene transfer efficiency to malignant glioma cells. *J. Neurosurg.* **107**, 617–627 (2007).
 517. Allen, C. *et al.* Retargeted Oncolytic Measles Strains Entering via the EGFRVIII Receptor Maintain Significant Antitumor Activity against Gliomas with Increased Tumor Specificity. *Cancer Res.* **66**, 11840–11850 (2006).
 518. Suksanpaisan, L., Russell, S. J. & Peng, K.-W. High scFv–receptor affinity does not enhance the antitumor activity of HER2-retargeted measles virus. *Cancer Gene Ther.* **21**, 256–260 (2014).
 519. Ayala-Breton, C., Barber, G. N., Russell, S. J. & Peng, K.-W. Retargeting vesicular stomatitis virus using measles virus envelope glycoproteins. *Hum. Gene Ther.* **23**, 484–91 (2012).
 520. Uchida, H. *et al.* Effective Treatment of an Orthotopic Xenograft Model of Human Glioblastoma Using an

- EGFR-retargeted Oncolytic Herpes Simplex Virus. *Mol. Ther.* **21**, 561–569 (2013).
521. Bergman, I., Whitaker-Dowling, P., Gao, Y., Griffin, J. A. & Watkins, S. C. Vesicular stomatitis virus expressing a chimeric Sindbis glycoprotein containing an Fc antibody binding domain targets to Her2/neu overexpressing breast cancer cells. *Virology* **316**, 337–47 (2003).
 522. Kamiyama, H., Zhou, G. & Roizman, B. Herpes simplex virus 1 recombinant virions exhibiting the amino terminal fragment of urokinase-type plasminogen activator can enter cells via the cognate receptor. *Gene Ther.* **13**, 621–629 (2006).
 523. Menotti, L., Cerretani, A. & Campadelli-Fiume, G. A Herpes Simplex Virus Recombinant That Exhibits a Single-Chain Antibody to HER2/neu Enters Cells through the Mammary Tumor Receptor, Independently of the gD Receptors. *J. Virol.* **80**, 5531–5539 (2006).
 524. Shibata, T. *et al.* Development of an oncolytic HSV vector fully retargeted specifically to cellular EpCAM for virus entry and cell-to-cell spread. *Gene Ther.* **23**, 479–488 (2016).
 525. Ong, H. T. *et al.* Intravascularly Administered RGD-Displaying Measles Viruses Bind to and Infect Neovessel Endothelial Cells In Vivo. *Mol. Ther.* **17**, 1012–1021 (2009).
 526. Ammayappan, A., Peng, K.-W. & Russell, S. J. Characteristics of Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus Displaying Tumor-Targeting Ligands. *J. Virol.* **87**, 13543–13555 (2013).
 527. Ranki, T. *et al.* A heparan sulfate-targeted conditionally replicative adenovirus, Ad5.pk7-Δ24, for the treatment of advanced breast cancer. *Gene Ther.* **14**, 58–67 (2007).
 528. Friedrich, K. *et al.* DARPIn-targeting of Measles Virus: Unique Bispecificity, Effective Oncolysis, and Enhanced Safety. *Mol. Ther.* **21**, 849–859 (2013).
 529. Baertsch, M. A. *et al.* MicroRNA-mediated multi-tissue detargeting of oncolytic measles virus. *Cancer Gene Ther.* **21**, 373–380 (2014).
 530. McCart, J. *et al.* Complex interactions between the replicating oncolytic effect and the enzyme/prodrug effect of vaccinia-mediated tumor regression. *Gene Ther.* **7**, 1217–1223 (2000).
 531. Edge, R. E. *et al.* A let-7 MicroRNA-sensitive Vesicular Stomatitis Virus Demonstrates Tumor-specific Replication. *Mol. Ther.* **16**, 1437–1443 (2008).
 532. Lee, C. Y. F., Rennie, P. S. & Jia, W. W. G. MicroRNA Regulation of Oncolytic Herpes Simplex Virus-1 for Selective Killing of Prostate Cancer Cells. *Clin. Cancer Res.* **15**, 5126–5135 (2009).
 533. Zhang, K.-X. *et al.* Intravesical treatment of advanced urothelial bladder cancers with oncolytic HSV-1 co-regulated by differentially expressed microRNAs. *Gene Ther.* **23**, 460–468 (2016).
 534. Msaouel, P., Iankov, I. D., Allen, C., Russell, S. J. & Galanis, E. Oncolytic measles virus retargeting by ligand display. *Methods Mol. Biol.* **797**, 141–62 (2012).
 535. Rodriguez, R. *et al.* Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res.* **57**, 2559–63 (1997).
 536. Chung, R. Y., Saeki, Y. & Chiocca, E. A. B-myb promoter retargeting of herpes simplex virus gamma34.5 gene-mediated virulence toward tumor and cycling cells. *J. Virol.* **73**, 7556–64 (1999).
 537. Kanai, R. *et al.* Enhanced therapeutic efficacy of G207 for the treatment of glioma through Musashi1 promoter retargeting of γ34.5-mediated virulence. *Gene Ther.* **13**, 106–116 (2006).
 538. Kasuya, H. *et al.* Selectivity of an oncolytic herpes simplex virus for cells expressing the DF3/MUC1 antigen. *Cancer Res.* **64**, 2561–7 (2004).
 539. Pin, R. H., Reinblatt, M. & Fong, Y. Utilizing alpha-fetoprotein expression to enhance oncolytic viral therapy in hepatocellular carcinoma. *Ann. Surg.* **240**, 659–65; discussion 665–6 (2004).
 540. Kuroda, T., Rabkin, S. D. & Martuza, R. L. Effective Treatment of Tumors with Strong β -Catenin/T-Cell Factor Activity by Transcriptionally Targeted Oncolytic Herpes Simplex Virus Vector. *Cancer Res.* **66**, 10127–10135 (2006).
 541. Zhang, W. *et al.* A novel oHSV-1 targeting telomerase reverse transcriptase-positive cancer cells via tumor-specific promoters regulating the expression of ICP4. *Oncotarget* **6**, 20345–55 (2015).
 542. Longo, S. L., Griffith, C., Glass, A., Shillitoe, E. J. & Post, D. E. Development of an oncolytic herpes simplex virus using a tumor-specific HIF-responsive promoter. *Cancer Gene Ther.* **18**, 123–134 (2011).
 543. Doloff, J. C., Waxman, D. J. & Waxman, D. J. Dual E1A oncolytic adenovirus: targeting tumor heterogeneity with two independent cancer-specific promoter elements, DF3/MUC1 and hTERT. *Cancer Gene Ther.* **18**, 153–166 (2011).
 544. Ono, H. A. *et al.* Promoter-controlled infectivity-enhanced conditionally replicative adenoviral vectors for the treatment of gastric cancer. *J. Gastroenterol.* **40**, 31–42 (2005).
 545. Delgado-Enciso, I. *et al.* A potent replicative delta-24 adenoviral vector driven by the promoter of human papillomavirus 16 that is highly selective for associated neoplasms. *J. Gene Med.* **9**, 852–861 (2007).
 546. Hsu, K.-F. *et al.* Conditionally replicating E1B-deleted adenovirus driven by the squamous cell carcinoma

- antigen 2 promoter for uterine cervical cancer therapy. *Cancer Gene Ther.* **15**, 526–534 (2008).
547. Tsuruta, Y. *et al.* A Fiber-Modified Mesothelin Promoter-Based Conditionally Replicating Adenovirus for Treatment of Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res.* **14**, 3582–3588 (2008).
548. Bilsland, A. E., Merron, A., Vassaux, G. & Keith, W. N. Modulation of Telomerase Promoter Tumor Selectivity in the Context of Oncolytic Adenoviruses. *Cancer Res.* **67**, 1299–1307 (2007).
549. Post, D. E. *et al.* Cancer Therapy with a Replicating Oncolytic Adenovirus Targeting the Hypoxic Microenvironment of Tumors. *Clin. Cancer Res.* **10**, 8603–8612 (2004).
550. Betancourt, D., Ramos, J. C. & Barber, G. N. Retargeting Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus to Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1-Associated Adult T-Cell Leukemia. *J. Virol.* **89**, 11786–11800 (2015).
551. Künzi, V., Oberholzer, P. A., Heinzerling, L., Dummer, R. & Naim, H. Y. Recombinant Measles Virus Induces Cytolysis of Cutaneous T-Cell Lymphoma In Vitro and In Vivo. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 2525–2532 (2006).
552. McCart, J. A. *et al.* Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. *Cancer Res.* **61**, 8751–7 (2001).
553. Stritzker, J. *et al.* Inducible gene expression in tumors colonized by modified oncolytic vaccinia virus strains. *J. Virol.* **88**, 11556–67 (2014).
554. Fernandez, M., Porosnicu, M., Markovic, D. & Barber, G. N. Genetically engineered vesicular stomatitis virus in gene therapy: application for treatment of malignant disease. *J. Virol.* **76**, 895–904 (2002).
555. Samoto, K. *et al.* A herpes simplex virus type 1 mutant deleted for γ 34.5 and LAT kills glioma cells in vitro and is inhibited for in vivo reactivation. *Cancer Gene Ther.* **8**, 269–277 (2001).
556. Israyelyan, A. H. *et al.* Effective Treatment of Human Breast Tumor in a Mouse Xenograft Model with Herpes Simplex Virus Type 1 Specifying the NV1020 Genomic Deletion and the gBsyn3 Syncytial Mutation Enabling High Viral Replication and Spread in Breast Cancer Cells. *Hum. Gene Ther.* **18**, 457–473 (2007).
557. Reinblatt, M., Pin, R. H. & Fong, Y. Carcinoembryonic antigen directed herpes viral oncolysis improves selectivity and activity in colorectal cancer. *Surgery* **136**, 579–584 (2004).
558. Li, H., Nakashima, H., Decklever, T. D., Nace, R. A. & Russell, S. J. HSV-NIS, an oncolytic herpes simplex virus type 1 encoding human sodium iodide symporter for preclinical prostate cancer radiovirotherapy. *Cancer Gene Ther.* **20**, 478–485 (2013).
559. Fueyo, J. *et al.* Preclinical characterization of the antiglioma activity of a tropism-enhanced adenovirus targeted to the retinoblastoma pathway. *J. Natl. Cancer Inst.* **95**, 652–60 (2003).
560. Kimball, K. J. *et al.* Novel infectivity-enhanced oncolytic adenovirus with a capsid-incorporated dual-imaging moiety for monitoring virotherapy in ovarian cancer. *Mol. Imaging* **8**, 264–77
561. Borovjagin, A. V *et al.* Noninvasive monitoring of mRFP1- and mCherry-labeled oncolytic adenoviruses in an orthotopic breast cancer model by spectral imaging. *Mol. Imaging* **9**, 59–75 (2010).
562. Peng, K.-W., Fecteau, S., Wegman, T., O’Kane, D. & Russell, S. J. Non-invasive in vivo monitoring of trackable viruses expressing soluble marker peptides. *Nat. Med.* **8**, 527–531 (2002).
563. Kaufman, H., Schlom, J. & Kantor, J. A recombinant vaccinia virus expressing human carcinoembryonic antigen (CEA). *Int. J. cancer* **48**, 900–7 (1991).
564. Chakrabarti, S., Srinivasan, J., Lall, L., Rao, L. V & Talwar, G. P. Expression of biologically active human chorionic gonadotropin and its subunits by recombinant vaccinia virus. *Gene* **77**, 87–93 (1989).
565. Kanerva, A. *et al.* Noninvasive dual modality in vivo monitoring of the persistence and potency of a tumor targeted conditionally replicating adenovirus. *Gene Ther.* **12**, 87–94 (2005).
566. Rajeci, M. *et al.* Treatment of prostate cancer with Ad5/3 24hCG allows non-invasive detection of the magnitude and persistence of virus replication in vivo. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 742–751 (2007).
567. Iankov, I. D., Hillestad, M. L., Dietz, A. B., Russell, S. J. & Galanis, E. Converting tumor-specific markers into reporters of oncolytic virus infection. *Mol. Ther.* **17**, 1395–403 (2009).
568. Yamamoto, S., Deckter, L. A., Kasai, K., Chiocca, E. A. & Saeki, Y. Imaging immediate-early and strict-late promoter activity during oncolytic herpes simplex virus type 1 infection and replication in tumors. *Gene Ther.* **13**, 1731–1736 (2006).
569. Penheiter, A. R. *et al.* Pinhole micro-SPECT/CT for noninvasive monitoring and quantitation of oncolytic virus dispersion and percent infection in solid tumors. *Gene Ther.* **19**, 279–287 (2012).
570. Haddad, D. *et al.* Insertion of the human sodium iodide symporter to facilitate deep tissue imaging does not alter oncolytic or replication capability of a novel vaccinia virus. *J. Transl. Med.* **9**, 36 (2011).
571. Goel, A. *et al.* Radioiodide imaging and radiovirotherapy of multiple myeloma using VSV(51)-NIS, an attenuated vesicular stomatitis virus encoding the sodium iodide symporter gene. *Blood* **110**, 2342–2350 (2007).
572. Muñoz-Álvarez, K. A. *et al.* PET Imaging of Oncolytic VSV Expressing the Mutant HSV-1 Thymidine Kinase Transgene in a Preclinical HCC Rat Model. *Mol. Ther.* **23**, 728–736 (2015).

573. Merron, A. *et al.* SPECT/CT imaging of oncolytic adenovirus propagation in tumours in vivo using the Na/I symporter as a reporter gene. *Gene Ther.* **14**, 1731–1738 (2007).
574. Jacobs, A. *et al.* Positron emission tomography-based imaging of transgene expression mediated by replication-conditional, oncolytic herpes simplex virus type 1 mutant vectors in vivo. *Cancer Res.* **61**, 2983–95 (2001).
575. Andrea McCart, J. *et al.* Oncolytic Vaccinia Virus Expressing the Human Somatostatin Receptor SSTR2: Molecular Imaging after Systemic Delivery Using ¹¹¹In-Pentetreotide. *Mol. Ther.* **10**, 553–561 (2004).
576. Dmitriev, I. P. *et al.* Monitoring of Biodistribution and Persistence of Conditionally Replicative Adenovirus in a Murine Model of Ovarian Cancer Using Capsid-Incorporated mCherry and Expression of Human Somatostatin Receptor Subtype 2 Gene. *Mol. Imaging* **13**, 7290.2014.00024 (2014).
577. Chen, N. *et al.* A novel recombinant vaccinia virus expressing the human norepinephrine transporter retains oncolytic potential and facilitates deep-tissue imaging. *Mol. Med.* **15**, 1 (2009).
578. Ungerechts, G. *et al.* Lymphoma Chemovirotherapy: CD20-Targeted and Convertase-Armed Measles Virus Can Synergize with Fludarabine. *Cancer Res.* **67**, 10939–10947 (2007).
579. Puhlmann, M., Gnant, M., Brown, C. K., Alexander, H. R. & Bartlett, D. L. Thymidine Kinase-Deleted Vaccinia Virus Expressing Purine Nucleoside Phosphorylase as a Vector for Tumor-Directed Gene Therapy. *Hum. Gene Ther.* **10**, 649–657 (1999).
580. Leveille, S., Samuel, S., Goulet, M.-L. & Hiscott, J. Enhancing VSV oncolytic activity with an improved cytosine deaminase suicide gene strategy. *Cancer Gene Ther.* **18**, 435–443 (2011).
581. Porosnicu, M., Mian, A. & Barber, G. N. The oncolytic effect of recombinant vesicular stomatitis virus is enhanced by expression of the fusion cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase suicide gene. *Cancer Res.* **63**, 8366–76 (2003).
582. Guffey, M. B. *et al.* Engineered herpes simplex virus expressing bacterial cytosine deaminase for experimental therapy of brain tumors. *Cancer Gene Ther.* **14**, 45–56 (2007).
583. Simpson, G. R. *et al.* Combination of a Fusogenic Glycoprotein, Prodrug Activation, and Oncolytic Herpes Simplex Virus for Enhanced Local Tumor Control. *Cancer Res.* **66**, 4835–4842 (2006).
584. Fuerer, C. & Iggo, R. 5-Fluorocytosine increases the toxicity of Wnt-targeting replicating adenoviruses that express cytosine deaminase as a late gene. *Gene Ther.* **11**, 142–151 (2004).
585. Zhang, Y. *et al.* Combination of ZD55-MnSOD therapy with 5-FU enhances antitumor efficacy in colorectal cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **134**, 219–226 (2007).
586. Dias, J. D. *et al.* Targeted Chemotherapy for Head and Neck Cancer with a Chimeric Oncolytic Adenovirus Coding for Bifunctional Suicide Protein FCU1. *Clin. Cancer Res.* **16**, 2540–2549 (2010).
587. Chase, M., Chung, R. Y. & Chiocca, E. A. An oncolytic viral mutant that delivers the CYP2B1 transgene and augments cyclophosphamide chemotherapy. *Nat. Biotechnol.* **16**, 444–448 (1998).
588. Braidwood, L., Dunn, P. D., Hardy, S., Evans, T. R. J. & Brown, S. M. Antitumor activity of a selectively replication competent herpes simplex virus (HSV) with enzyme prodrug therapy. *Anticancer Res.* **29**, 2159–66 (2009).
589. Chen, M.-J. *et al.* Enhanced efficacy of Escherichia coli nitroreductase/CB1954 prodrug activation gene therapy using an E1B-55K-deleted oncolytic adenovirus vector. *Gene Ther.* **11**, 1126–1136 (2004).
590. Singleton, D. C. *et al.* The nitroreductase prodrug SN 28343 enhances the potency of systemically administered armed oncolytic adenovirus ONYX-411NTR. *Cancer Gene Ther.* **14**, 953–967 (2007).
591. Ishida, D. *et al.* Enhanced cytotoxicity with a novel system combining the paclitaxel-2'-ethylcarbonate prodrug and an HSV amplicon with an attenuated replication-competent virus, HF10 as a helper virus. *Cancer Lett.* **288**, 17–27 (2010).
592. Schepelmann, S. *et al.* Suicide Gene Therapy of Human Colon Carcinoma Xenografts Using an Armed Oncolytic Adenovirus Expressing Carboxypeptidase G2. *Cancer Res.* **67**, 4949–4955 (2007).
593. Li, J. *et al.* The adenovirus-mediated linamarase/linamarin suicide system: A potential strategy for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* **289**, 217–227 (2010).
594. Redaelli, M. *et al.* Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase-armed bovine herpesvirus type 4-based vector displays enhanced oncolytic properties in immunocompetent orthotopic syngenic mouse and rat glioma models. *Neuro. Oncol.* **14**, 288–301 (2012).
595. Wildner, O. *et al.* Adenoviral vectors capable of replication improve the efficacy of HSVtk/GCV suicide gene therapy of cancer. *Gene Ther.* **6**, 57–62 (1999).
596. Oosterhoff, D. *et al.* Gene-directed enzyme prodrug therapy with carboxylesterase enhances the anticancer efficacy of the conditionally replicating adenovirus AdΔ24. *Gene Ther.* **12**, 1011–1018 (2005).
597. Kirn, D. H., Wang, Y., Le Boeuf, F., Bell, J. & Thorne, S. H. Targeting of Interferon-Beta to Produce a Specific, Multi-Mechanistic Oncolytic Vaccinia Virus. *PLoS Med.* **4**, e353 (2007).

598. Bourgeois-Daigneault, M.-C. *et al.* Oncolytic vesicular stomatitis virus expressing interferon- σ has enhanced therapeutic activity. *Mol. Ther. - Oncolytics* **3**, 16001 (2016).
599. He, L. F. *et al.* Significant antitumor activity of oncolytic adenovirus expressing human interferon- β for hepatocellular carcinoma. *J. Gene Med.* **10**, 983–992 (2008).
600. Shashkova, E. V, Kuppuswamy, M. N., Wold, W. S. M. & Doronin, K. Anticancer activity of oncolytic adenovirus vector armed with IFN- α and ADP is enhanced by pharmacologically controlled expression of TRAIL. *Cancer Gene Ther.* **15**, 61–72 (2008).
601. Veinalde, R. *et al.* Oncolytic measles virus encoding interleukin-12 mediates potent antitumor effects through T cell activation. *Oncoimmunology* **6**, e1285992 (2017).
602. Stephenson, K. B., Barra, N. G., Davies, E., Ashkar, A. A. & Lichty, B. D. Expressing human interleukin-15 from oncolytic vesicular stomatitis virus improves survival in a murine metastatic colon adenocarcinoma model through the enhancement of anti-tumor immunity. *Cancer Gene Ther.* **19**, 238–246 (2012).
603. Miller, J., Bidula, S. M., Jensen, T. M. & Reiss, C. S. Cytokine-modified VSV is attenuated for neural pathology, but is both highly immunogenic and oncolytic. *Int. J. Interf. cytokine Mediat. Res.* **1**, 15–32 (2009).
604. Andreansky, S. *et al.* Treatment of intracranial gliomas in immunocompetent mice using herpes simplex viruses that express murine interleukins. *Gene Ther.* **5**, 121–130 (1998).
605. Parker, J. N. *et al.* Engineered herpes simplex virus expressing IL-12 in the treatment of experimental murine brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 2208–2213 (2000).
606. Gaston, D. C. *et al.* Production of Bioactive Soluble Interleukin-15 in Complex with Interleukin-15 Receptor Alpha from a Conditionally-Replicating Oncolytic HSV-1. *PLoS One* **8**, e81768 (2013).
607. Fukuhara, H., Ino, Y., Kuroda, T., Martuza, R. L. & Todo, T. Triple Gene-Deleted Oncolytic Herpes Simplex Virus Vector Double-Armed with Interleukin 18 and Soluble B7-1 Constructed by Bacterial Artificial Chromosome-Mediated System. *Cancer Res.* **65**, 10663–10668 (2005).
608. Post, D. E. *et al.* Targeted Cancer Gene Therapy Using a Hypoxia Inducible Factor Dependent Oncolytic Adenovirus Armed with Interleukin-4. *Cancer Res.* **67**, 6872–6881 (2007).
609. Bortolanza, S. *et al.* Treatment of Pancreatic Cancer With an Oncolytic Adenovirus Expressing Interleukin-12 in Syrian Hamsters. *Mol. Ther.* **17**, 614–622 (2009).
610. Yoo, J. Y. *et al.* Short hairpin RNA-expressing oncolytic adenovirus-mediated inhibition of IL-8: effects on angiogenesis and tumor growth inhibition. *Gene Ther.* **15**, 635–651 (2008).
611. Li, J. *et al.* Chemokine Expression From Oncolytic Vaccinia Virus Enhances Vaccine Therapies of Cancer. *Mol. Ther.* **19**, 650–657 (2011).
612. Li, J. *et al.* Expression of CCL19 from oncolytic vaccinia enhances immunotherapeutic potential while maintaining oncolytic activity. *Neoplasia* **14**, 1115–21 (2012).
613. Bauzon, M., Castro, D., Karr, M., Hawkins, L. K. & Hermiston, T. W. Multigene expression from a replicating adenovirus using native viral promoters. *Mol. Ther.* **7**, 526–34 (2003).
614. Bergman, I., Griffin, J. A., Gao, Y. & Whitaker-Dowling, P. Treatment of implanted mammary tumors with recombinant vesicular stomatitis virus targeted to Her2/neu. *Int. J. Cancer* **121**, 425–430 (2007).
615. Wong, R. J. *et al.* Cytokine Gene Transfer Enhances Herpes Oncolytic Therapy in Murine Squamous Cell Carcinoma. *Hum. Gene Ther.* **12**, 253–265 (2001).
616. Ramesh, N. *et al.* CG0070, a Conditionally Replicating Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor-Armed Oncolytic Adenovirus for the Treatment of Bladder Cancer. *Clin. Cancer Res.* **12**, 305–313 (2006).
617. Liu, C., Suksanpaisan, L., Chen, Y.-W., Russell, S. J. & Peng, K.-W. Enhancing cytokine-induced killer cell therapy of multiple myeloma. *Exp. Hematol.* **41**, 508–517 (2013).
618. Zhang, Y.-Q., Tsai, Y.-C., Monie, A., Wu, T.-C. & Hung, C.-F. Enhancing the Therapeutic Effect Against Ovarian Cancer Through a Combination of Viral Oncolysis and Antigen-specific Immunotherapy. *Mol. Ther.* **18**, 692–699 (2010).
619. Wongthida, P. *et al.* Activating Systemic T-Cell Immunity Against Self Tumor Antigens to Support Oncolytic Virotherapy with Vesicular Stomatitis Virus. *Hum. Gene Ther.* **22**, 1343–1353 (2011).
620. Ohashi, T., Nakamura, T., Kidokoro, M., Zhang, X. & Shida, H. Combined Cytolytic Effects of a Vaccinia Virus Encoding a Single Chain Trimer of MHC-I with a Tax-Epitope and Tax-Specific CTLs on HTLV-I-Infected Cells in a Rat Model. *Biomed Res. Int.* **2014**, 1–13 (2014).
621. Choi, K.-J. *et al.* Concurrent delivery of GM-CSF and B7-1 using an oncolytic adenovirus elicits potent antitumor effect. *Gene Ther.* **13**, 1010–1020 (2006).
622. Huang, J.-H. *et al.* Therapeutic and Tumor-specific Immunity Induced by Combination of Dendritic Cells and Oncolytic Adenovirus Expressing IL-12 and 4-1BBL. *Mol. Ther.* **18**, 264–274 (2010).
623. Han, Z. Q. *et al.* Development of a second-generation oncolytic Herpes simplex virus expressing TNF α for

- cancer therapy. *J. Gene Med.* **9**, 99–106 (2007).
624. Walker, J. D., Sehgal, I. & Kousoulas, K. G. Oncolytic Herpes Simplex Virus 1 Encoding 15-Prostaglandin Dehydrogenase Mitigates Immune Suppression and Reduces Ectopic Primary and Metastatic Breast Cancer in Mice. *J. Virol.* **85**, 7363–7371 (2011).
 625. Cui, Q. *et al.* Transfer of suppressor of cytokine signaling 3 by an oncolytic adenovirus induces potential antitumor activities in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **47**, 105–112 (2007).
 626. Ren, Z. *et al.* Intratumor injection of oncolytic adenovirus expressing HSP70 prolonged survival in melanoma B16 bearing mice by enhanced immune response. *Cancer Biol. Ther.* **7**, 191–95 (2008).
 627. Barnard, Z. *et al.* Expression of FMS-like Tyrosine Kinase 3 Ligand by Oncolytic Herpes Simplex Virus Type I Prolongs Survival in Mice Bearing Established Syngeneic Intracranial Malignant Glioma. *Neurosurgery* **71**, 741–748 (2012).
 628. Mullen, J. T. *et al.* Oncolysis by viral replication and inhibition of angiogenesis by a replication-conditional herpes simplex virus that expresses mouse endostatin. *Cancer* **101**, 869–877 (2004).
 629. Zhang, W. *et al.* Combination of oncolytic herpes simplex viruses armed with angiostatin and IL-12 enhances antitumor efficacy in human glioblastoma models. *Neoplasia* **15**, 591–9 (2013).
 630. Li, G. *et al.* Potent antitumor efficacy of an E1B 55kDa-deficient adenovirus carrying murine endostatin in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* **113**, 640–648 (2005).
 631. Frentzen, A. *et al.* Anti-VEGF single-chain antibody GLAF-1 encoded by oncolytic vaccinia virus significantly enhances antitumor therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 12915–12920 (2009).
 632. Kang, Y.-A. *et al.* Novel Cancer Antiangiotherapy Using the VEGF Promoter-targeted Artificial Zinc-finger Protein and Oncolytic Adenovirus. *Mol. Ther.* **16**, 1033–1040 (2008).
 633. Liu, T.-C. *et al.* Oncolytic HSV Armed with Platelet Factor 4, an Antiangiogenic Agent, Shows Enhanced Efficacy. *Mol. Ther.* **14**, 789–797 (2006).
 634. Wang, Z.-G., Zhao, W., Ramachandra, M. & Seth, P. An oncolytic adenovirus expressing soluble transforming growth factor- type II receptor for targeting breast cancer: in vitro evaluation. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 367–373 (2006).
 635. Ong, H. T., Hasegawa, K., Dietz, A. B., Russell, S. J. & Peng, K.-W. Evaluation of T cells as carriers for systemic measles virotherapy in the presence of antiviral antibodies. *Gene Ther.* **14**, 324–333 (2007).
 636. Peng, K.-W. *et al.* Tumor-associated macrophages infiltrate plasmacytomas and can serve as cell carriers for oncolytic measles virotherapy of disseminated myeloma. *Am. J. Hematol.* **84**, 401–407 (2009).
 637. Wei, J. *et al.* Targeted release of oncolytic measles virus by blood outgrowth endothelial cells in situ inhibits orthotopic gliomas. *Gene Ther.* **14**, 1573–1586 (2007).
 638. Mader, E. K. *et al.* Mesenchymal Stem Cell Carriers Protect Oncolytic Measles Viruses from Antibody Neutralization in an Orthotopic Ovarian Cancer Therapy Model. *Clin. Cancer Res.* **15**, 7246–7255 (2009).
 639. Lemay, C. G. *et al.* Harnessing Oncolytic Virus-mediated Antitumor Immunity in an Infected Cell Vaccine. *Mol. Ther.* **20**, 1791–1799 (2012).
 640. Eisenstein, S. *et al.* Myeloid-Derived Suppressor Cells as a Vehicle for Tumor-Specific Oncolytic Viral Therapy. *Cancer Res.* **73**, 5003–5015 (2013).
 641. Coukos, G. *et al.* Use of carrier cells to deliver a replication-selective herpes simplex virus-1 mutant for the intraperitoneal therapy of epithelial ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* **5**, 1523–37 (1999).
 642. Rath, P. *et al.* Stem cells as vectors to deliver HSV/tk gene therapy for malignant gliomas. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **4**, 44–9 (2009).
 643. Fujiwara, S. *et al.* Carrier cell-based delivery of replication-competent HSV-1 mutants enhances antitumor effect for ovarian cancer. *Cancer Gene Ther.* **18**, 77–86 (2011).
 644. Hamada, K. *et al.* Carrier cell-mediated cell lysis of squamous cell carcinoma cells by squamous cell carcinoma antigen 1 promoter-driven oncolytic adenovirus. *J. Gene Med.* **12**, 545–554 (2010).
 645. Sonabend, A. M. *et al.* Mesenchymal Stem Cells Effectively Deliver an Oncolytic Adenovirus to Intracranial Glioma. *Stem Cells* **26**, 831–841 (2008).
 646. Schäfer, S. *et al.* Vaccinia virus-mediated intra-tumoral expression of matrix metalloproteinase 9 enhances oncolysis of PC-3 xenograft tumors. *BMC Cancer* **12**, 366 (2012).
 647. Mahller, Y. Y. *et al.* Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 via Oncolytic Herpesvirus Inhibits Tumor Growth and Vascular Progenitors. *Cancer Res.* **68**, 1170–1179 (2008).
 648. McNally, L. R., Rosenthal, E. L., Zhang, W. & Buchsbaum, D. J. Therapy of head and neck squamous cell carcinoma with replicative adenovirus expressing tissue inhibitor of metalloproteinase-2 and chemoradiation. *Cancer Gene Ther.* **16**, 246–255 (2009).
 649. Lamfers, M. L. M. *et al.* Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 Expression from an Oncolytic Adenovirus Inhibits Matrix Metalloproteinase Activity *In vivo* without Affecting Antitumor Efficacy in Malignant

- Glioma. *Cancer Res.* **65**, 9398–9405 (2005).
650. Ziauddin, M. F. *et al.* TRAIL gene-armed oncolytic poxvirus and oxaliplatin can work synergistically against colorectal cancer. *Gene Ther.* **17**, 550–559 (2010).
651. Galivo, F. *et al.* Interference of CD40L-Mediated Tumor Immunotherapy by Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus. *Hum. Gene Ther.* **21**, 439–450 (2010).
652. Loya, S. M. W. & Zhang, X. Enhancing the bystander killing effect of an oncolytic HSV by arming it with a secretable apoptosis activator. *Gene Ther.* **22**, 21–30 (2015).
653. Zhao, L. *et al.* The antitumor activity of TRAIL and IL-24 with replicating oncolytic adenovirus in colorectal cancer. *Cancer Gene Ther.* **13**, 1011–1022 (2006).
654. Gomes, E. M. *et al.* Antitumor Activity of an Oncolytic Adenoviral-CD40 Ligand (CD154) Transgene Construct in Human Breast Cancer Cells. *Clin. Cancer Res.* **15**, 1317–1325 (2009).
655. Chen, X. *et al.* Dual silencing of Bcl-2 and Survivin by HSV-1 vector shows better antitumor efficacy in higher PKR phosphorylation tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther.* **22**, 380–386 (2015).
656. Pan, Q. *et al.* Synergistic antitumor activity of XIAP-shRNA and TRAIL expressed by oncolytic adenoviruses in experimental HCC. *Acta Oncol. (Madr.)* **47**, 135–144 (2008).
657. PAN, Q. *et al.* Enhanced sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to chemotherapy with a Smac-armed oncolytic adenovirus. *Acta Pharmacol. Sin.* **28**, 1996–2004 (2007).
658. Hioki, M. *et al.* Combination of oncolytic adenovirotherapy and Bax gene therapy in human cancer xenografted models. Potential merits and hurdles for combination therapy. *Int. J. Cancer* **122**, 2628–2633 (2008).
659. Nguyen, D. H. *et al.* Vaccinia Virus-mediated Expression of Human Erythropoietin in Tumors Enhances Virotherapy and Alleviates Cancer-related Anemia in Mice. *Mol. Ther.* **21**, 2054–2062 (2013).
660. Hasegawa, K. *et al.* Affinity thresholds for membrane fusion triggering by viral glycoproteins. *J. Virol.* **81**, 13149–57 (2007).
661. Springfield, C. *et al.* Oncolytic Efficacy and Enhanced Safety of Measles Virus Activated by Tumor-Secreted Matrix Metalloproteinases. *Cancer Res.* **66**, 7694–7700 (2006).
662. Bartel, D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* **136**, 215–233 (2009).
663. Lu, J. *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**, 834–838 (2005).
664. Kefas, B. *et al.* microRNA-7 Inhibits the Epidermal Growth Factor Receptor and the Akt Pathway and Is Down-regulated in Glioblastoma. *Cancer Res.* **68**, 3566–3572 (2008).
665. Parker, W. B. *et al.* Metabolism and metabolic actions of 6-methylpurine and 2-fluoroadenine in human cells. *Biochem. Pharmacol.* **55**, 1673–81 (1998).
666. Erbs, P. *et al.* In vivo cancer gene therapy by adenovirus-mediated transfer of a bifunctional yeast cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase fusion gene. *Cancer Res.* **60**, 3813–22 (2000).
667. Gnant, M. F., Puhlmann, M., Alexander, H. R. & Bartlett, D. L. Systemic administration of a recombinant vaccinia virus expressing the cytosine deaminase gene and subsequent treatment with 5-fluorocytosine leads to tumor-specific gene expression and prolongation of survival in mice. *Cancer Res.* **59**, 3396–403 (1999).
668. Tysome, J. R. *et al.* Lister strain of vaccinia virus armed with endostatin-angiostatin fusion gene as a novel therapeutic agent for human pancreatic cancer. *Gene Ther.* **16**, 1223–33 (2009).
669. Grossardt, C. *et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-armed oncolytic measles virus is an effective therapeutic cancer vaccine. *Hum. Gene Ther.* **24**, 644–54 (2013).
670. Jing, Y., Zaias, J., Duncan, R., Russell, S. J. & Merchan, J. R. In vivo safety, biodistribution and antitumor effects of uPAR retargeted oncolytic measles virus in syngeneic cancer models. *Gene Ther.* **21**, 289–297 (2014).
671. Speck, T. *et al.* Targeted BiTE Expression by an Oncolytic Vector Augments Therapeutic Efficacy Against Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* (2018). doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-2651
672. Le Boeuf, F. *et al.* Synergistic Interaction Between Oncolytic Viruses Augments Tumor Killing. *Mol. Ther.* **18**, 888–895 (2010).
673. Parviainen, S. *et al.* GM-CSF-armed vaccinia virus induces an antitumor immune response. *Int. J. Cancer* **136**, 1065–1072 (2015).
674. Chalikonda, S. *et al.* Oncolytic virotherapy for ovarian carcinomatosis using a replication-selective vaccinia virus armed with a yeast cytosine deaminase gene. *Cancer Gene Ther.* **15**, 115–25 (2008).
675. Rojas, J. J., Sampath, P., Hou, W. & Thorne, S. H. Defining Effective Combinations of Immune Checkpoint Blockade and Oncolytic Virotherapy. *Clin. Cancer Res.* **21**, 5543–51 (2015).
676. Fend, L. *et al.* Immune Checkpoint Blockade, Immunogenic Chemotherapy or IFN- α Blockade Boost the Local and Abscopal Effects of Oncolytic Virotherapy. *Cancer Res.* **77**, 4146–4157 (2017).

677. Tsoneva, D. *et al.* Humanized Mice with Subcutaneous Human Solid Tumors for Immune Response Analysis of Vaccinia Virus-Mediated Oncolysis. *Mol. Ther. oncolytics* **5**, 41–61 (2017).
678. Dispenzieri, A. *et al.* Phase I trial of systemic administration of Edmonston strain of measles virus genetically engineered to express the sodium iodide symporter in patients with recurrent or refractory multiple myeloma. *Leukemia* **31**, 2791–2798 (2017).
679. Hwang, T.-H. *et al.* A mechanistic proof-of-concept clinical trial with JX-594, a targeted multi-mechanistic oncolytic poxvirus, in patients with metastatic melanoma. *Mol. Ther.* **19**, 1913–22 (2011).
680. Park, B.-H. *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**, 533–542 (2008).
681. Kaufman, H. L. *et al.* Local and Distant Immunity Induced by Intralesional Vaccination with an Oncolytic Herpes Virus Encoding GM-CSF in Patients with Stage IIIc and IV Melanoma. *Ann. Surg. Oncol.* **17**, 718–730 (2010).
682. Andtbacka, R. H. I. *et al.* Cutaneous head and neck melanoma in OPTiM, a randomized phase 3 trial of talimogene laherparepvec versus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for the treatment of unresected stage IIIB/IIIC/IV melanoma. *Head Neck* **38**, 1752–1758 (2016).
683. Andtbacka, R. H. I. *et al.* Patterns of Clinical Response with Talimogene Laherparepvec (T-VEC) in Patients with Melanoma Treated in the OPTiM Phase III Clinical Trial. *Ann. Surg. Oncol.* **23**, 4169–4177 (2016).
684. Harrington, K. *et al.* Efficacy and safety of talimogene laherparepvec versus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with stage IIIB/C and IVM1a melanoma: subanalysis of the Phase III OPTiM trial. *Onco. Targets. Ther.* **Volume 9**, 7081–7093 (2016).
685. Andtbacka, R. H. I. *et al.* Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J. Clin. Oncol.* **33**, 2780–2788 (2015).
686. Kemeny, N. *et al.* Phase I, Open-Label, Dose-Escalating Study of a Genetically Engineered Herpes Simplex Virus, NV1020, in Subjects with Metastatic Colorectal Carcinoma to the Liver. *Hum. Gene Ther.* **17**, 1214–1224 (2006).
687. Geevarghese, S. K. *et al.* Phase I/II Study of Oncolytic Herpes Simplex Virus NV1020 in Patients with Extensively Pretreated Refractory Colorectal Cancer Metastatic to the Liver. *Hum. Gene Ther.* **21**, 1119–1128 (2010).
688. Markert, J. M. *et al.* Phase Ib Trial of Mutant Herpes Simplex Virus G207 Inoculated Pre- and Post-tumor Resection for Recurrent GBM. *Mol. Ther.* **17**, 199–207 (2009).
689. Markert, J. M. *et al.* Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther.* **7**, 867–874 (2000).
690. Lamont, J. P., Nemunaitis, J., Kuhn, J. A., Landers, S. A. & McCarty, T. M. A prospective phase II trial of ONYX-015 adenovirus and chemotherapy in recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck (the Baylor experience). *Ann. Surg. Oncol.* **7**, 588–92 (2000).
691. Khuri, F. R. *et al.* a controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat. Med.* **6**, 879–885 (2000).
692. Burke, J. M. *et al.* A first in human phase 1 study of CG0070, a GM-CSF expressing oncolytic adenovirus, for the treatment of nonmuscle invasive bladder cancer. *J. Urol.* **188**, 2391–7 (2012).
693. Gong, J., Sachdev, E., Mita, A. C. & Mita, M. M. Clinical development of reovirus for cancer therapy: An oncolytic virus with immune-mediated antitumor activity. *World J. Methodol.* **6**, 25–42 (2016).
694. Bernstein, V. *et al.* A randomized phase II study of weekly paclitaxel with or without pelareorep in patients with metastatic breast cancer: final analysis of Canadian Cancer Trials Group IND.213. *Breast Cancer Res. Treat.* **167**, 485–493 (2018).
695. Bradbury, P. A. *et al.* Canadian Cancer Trials Group (CCTG) IND211: A randomized trial of pelareorep (Reolysin) in patients with previously treated advanced or metastatic non-small cell lung cancer receiving standard salvage therapy. *Lung Cancer* **120**, 142–148 (2018).
696. Noonan, A. M. *et al.* Randomized Phase 2 Trial of the Oncolytic Virus Pelareorep (Reolysin) in Upfront Treatment of Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. *Mol. Ther.* **24**, 1150–1158 (2016).
697. Mahalingam, D. *et al.* The combination of intravenous Reolysin and gemcitabine induces reovirus replication and endoplasmic reticular stress in a patient with KRAS-activated pancreatic cancer. *BMC Cancer* **15**, 513 (2015).
698. Mahalingam, D. *et al.* A phase II study of REOLYSIN® (pelareorep) in combination with carboplatin and paclitaxel for patients with advanced malignant melanoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **79**, 697–703 (2017).
699. Sborov, D. W. *et al.* A Phase I Trial of Single-Agent Reolysin in Patients with Relapsed Multiple Myeloma.

- Clin. Cancer Res.* **20**, 5946–5955 (2014).
700. González-Navajas, J. M., Lee, J., David, M. & Raz, E. Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 125–135 (2012).
701. Trinchieri, G. & Santoli, D. Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Enhancement of human natural killer cell activity by interferon and antagonistic inhibition of susceptibility of target cells to lysis. *J. Exp. Med.* **147**, 1314–33 (1978).
702. Henry, T. *et al.* Type I IFN Signaling Constrains IL-17A/F Secretion by T Cells during Bacterial Infections. *J. Immunol.* **184**, 3755–3767 (2010).
703. Santini, S. M. *et al.* Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J. Exp. Med.* **191**, 1777–88 (2000).
704. Dalod, M. *et al.* Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J. Exp. Med.* **195**, 517–28 (2002).
705. Trinchieri, G. Type I interferon: friend or foe? *J. Exp. Med.* **207**, 2053–63 (2010).
706. Levings, M. K. *et al.* IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J. Immunol.* **166**, 5530–9 (2001).
707. Schneider, W. M., Chevillotte, M. D. & Rice, C. M. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 513–45 (2014).
708. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**, 373–384 (2010).
709. Loo, Y.-M., Gale, M. & Jr. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* **34**, 680–92 (2011).
710. Goubau, D., Deddouche, S. & Reis e Sousa, C. Cytosolic sensing of viruses. *Immunity* **38**, 855–69 (2013).
711. Leung, D. W. & Amarasinghe, G. K. Structural insights into RNA recognition and activation of RIG-I-like receptors. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **22**, 297–303 (2012).
712. Hornung, V. *et al.* 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**, 994–7 (2006).
713. Pichlmair, A. *et al.* RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* **314**, 997–1001 (2006).
714. Schlee, M. *et al.* Recognition of 5' Triphosphate by RIG-I Helicase Requires Short Blunt Double-Stranded RNA as Contained in Panhandle of Negative-Strand Virus. *Immunity* **31**, 25–34 (2009).
715. Cazenave, C. *et al.* RNA template-directed RNA synthesis by T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 6972–6 (1994).
716. Weber, M. *et al.* Incoming RNA virus nucleocapsids containing a 5'-triphosphorylated genome activate RIG-I and antiviral signaling. *Cell Host Microbe* **13**, 336–46 (2013).
717. Plumet, S. *et al.* Cytosolic 5'-triphosphate ended viral leader transcript of measles virus as activator of the RIG I-mediated interferon response. *PLoS One* **2**, e279 (2007).
718. Rehwinkel, J. *et al.* RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection. *Cell* **140**, 397–408 (2010).
719. Oshiumi, H., Miyashita, M., Matsumoto, M. & Seya, T. A Distinct Role of Riplet-Mediated K63-Linked Polyubiquitination of the RIG-I Repressor Domain in Human Antiviral Innate Immune Responses. *PLoS Pathog.* **9**, e1003533 (2013).
720. Liu, H. M. *et al.* The Mitochondrial Targeting Chaperone 14-3-3 ϵ Regulates a RIG-I Translocon that Mediates Membrane Association and Innate Antiviral Immunity. *Cell Host Microbe* **11**, 528–537 (2012).
721. Jiang, X. *et al.* Ubiquitin-Induced Oligomerization of the RNA Sensors RIG-I and MDA5 Activates Antiviral Innate Immune Response. *Immunity* **36**, 959–973 (2012).
722. Kato, H. *et al.* Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441**, 101–105 (2006).
723. Feng, Q. *et al.* MDA5 Detects the Double-Stranded RNA Replicative Form in Picornavirus-Infected Cells. *Cell Rep.* **2**, 1187–1196 (2012).
724. Nakaya, Y., Lilue, J., Stavrou, S., Moran, E. A. & Ross, S. R. AIM2-Like Receptors Positively and Negatively Regulate the Interferon Response Induced by Cytosolic DNA. *MBio* **8**, (2017).
725. Hornung, V. *et al.* AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* **458**, 514–518 (2009).
726. Gray, E. E. *et al.* The AIM2-like Receptors Are Dispensable for the Interferon Response to Intracellular DNA. *Immunity* **45**, 255–266 (2016).
727. Wang, Z. *et al.* Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 5477–82 (2008).
728. Chiu, Y.-H., MacMillan, J. B. & Chen, Z. J. RNA Polymerase III Detects Cytosolic DNA and Induces Type I Interferons through the RIG-I Pathway. *Cell* **138**, 576–591 (2009).

729. Chen, Q., Sun, L. & Chen, Z. J. Regulation and function of the cGAS–STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat. Immunol.* **17**, 1142–1149 (2016).
730. Zhu, J., Ghosh, A. & Sarkar, S. N. OASL—a new player in controlling antiviral innate immunity. *Curr. Opin. Virol.* **12**, 15–9 (2015).
731. McAllister, C. S. & Samuel, C. E. The RNA-activated protein kinase enhances the induction of interferon-beta and apoptosis mediated by cytoplasmic RNA sensors. *J. Biol. Chem.* **284**, 1644–51 (2009).
732. West, A. P., Shadel, G. S. & Ghosh, S. Mitochondria in innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 389–402 (2011).
733. Vazquez, C. & Horner, S. M. MAVS Coordination of Antiviral Innate Immunity. *J. Virol.* **89**, 6974–7 (2015).
734. Brubaker, S. W., Gauthier, A. E., Mills, E. W., Ingolia, N. T. & Kagan, J. C. A Bicistronic MAVS Transcript Highlights a Class of Truncated Variants in Antiviral Immunity. *Cell* **156**, 800–811 (2014).
735. Horner, S. M. *et al.* Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 14590–5 (2011).
736. Liu, S. *et al.* Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science (80-.).* **347**, aaa2630-aaa2630 (2015).
737. Fang, R. *et al.* MAVS activates TBK1 and IKKε through TRAFs in NEMO dependent and independent manner. *PLOS Pathog.* **13**, e1006720 (2017).
738. Bakshi, S., Taylor, J., Strickson, S., McCartney, T. & Cohen, P. Identification of TBK1 complexes required for the phosphorylation of IRF3 and the production of interferon β. *Biochem. J.* **474**, 1163–1174 (2017).
739. van Zuylen, W. J. *et al.* Proteomic profiling of the TRAF3 interactome network reveals a new role for the ER-to-Golgi transport compartments in innate immunity. *PLoS Pathog.* **8**, e1002747 (2012).
740. Ishikawa, H. & Barber, G. N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* **455**, 674–8 (2008).
741. Ishikawa, H., Ma, Z. & Barber, G. N. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* **461**, 788–92 (2009).
742. Tanaka, Y. & Chen, Z. J. STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. *Sci. Signal.* **5**, ra20 (2012).
743. Abe, T. & Barber, G. N. Cytosolic-DNA-Mediated, STING-Dependent Proinflammatory Gene Induction Necessitates Canonical NF- B Activation through TBK1. *J. Virol.* **88**, 5328–5341 (2014).
744. Honda, K., Takaoka, A. & Taniguchi, T. Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* **25**, 349–60 (2006).
745. Sato, M., Tanaka, N., Hata, N., Oda, E. & Taniguchi, T. Involvement of the IRF family transcription factor IRF-3 in virus-induced activation of the IFN-beta gene. *FEBS Lett.* **425**, 112–6 (1998).
746. Yoneyama, M. *et al.* Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J.* **17**, 1087–1095 (1998).
747. Lin, R., Heylbroeck, C., Pitha, P. M. & Hiscott, J. Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2986–96 (1998).
748. Karin, M. & Delhase, M. The IκB kinase (IKK) and NF-κB: key elements of proinflammatory signalling. *Semin. Immunol.* **12**, 85–98 (2000).
749. Whiteside, S. T. *et al.* I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. *EMBO J.* **16**, 1413–1426 (1997).
750. Honda, K. & Taniguchi, T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 644–658 (2006).
751. Kim, T. K. & Maniatis, T. The mechanism of transcriptional synergy of an in vitro assembled interferon-beta enhanceosome. *Mol. Cell* **1**, 119–29 (1997).
752. Schafer, S. L., Lin, R., Moore, P. A., Hiscott, J. & Pitha, P. M. Regulation of type I interferon gene expression by interferon regulatory factor-3. *J. Biol. Chem.* **273**, 2714–20 (1998).
753. Wathélet, M. G. *et al.* Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo. *Mol. Cell* **1**, 507–18 (1998).
754. Sato, M. *et al.* Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett.* **441**, 106–10 (1998).
755. Marie, I., Durbin, J. E. & Levy, D. E. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J.* **17**, 6660–6669 (1998).
756. Ning, S., Pagano, J. S. & Barber, G. N. IRF7: activation, regulation, modification and function. *Genes Immun.* **12**, 399–414 (2011).
757. ISAACS, A. & LINDENMANN, J. Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.*

- 147, 258–67 (1957).
758. Decker, T., Müller, M. & Stockinger, S. The Yin and Yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 675–687 (2005).
759. Colonna, M., Trinchieri, G. & Liu, Y.-J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat. Immunol.* **5**, 1219–1226 (2004).
760. Colamonici, O. R. & Domanski, P. Identification of a novel subunit of the type I interferon receptor localized to human chromosome 21. *J. Biol. Chem.* **268**, 10895–9 (1993).
761. Colamonici, O. R. *et al.* Interferon alpha (IFN alpha) signaling in cells expressing the variant form of the type I IFN receptor. *J. Biol. Chem.* **269**, 5660–5 (1994).
762. Thomas, C. *et al.* Structural linkage between ligand discrimination and receptor activation by type I interferons. *Cell* **146**, 621–32 (2011).
763. Piehler, J., Thomas, C., Garcia, K. C. & Schreiber, G. Structural and dynamic determinants of type I interferon receptor assembly and their functional interpretation. *Immunol. Rev.* **250**, 317–34 (2012).
764. Ghislain, J., Sussman, G., Goelz, S., Ling, L. E. & Fish, E. N. Configuration of the interferon-alpha/beta receptor complex determines the context of the biological response. *J. Biol. Chem.* **270**, 21785–92 (1995).
765. Russell-Harde, D., Wagner, T. C., Perez, H. D. & Croze, E. Formation of a Uniquely Stable Type I Interferon Receptor Complex by Interferon β Is Dependent upon Particular Interactions between Interferon β and Its Receptor and Independent of Tyrosine Phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**, 539–544 (1999).
766. Russell-Harde, D. *et al.* Reconstitution of a high affinity binding site for type I interferons. *J. Biol. Chem.* **270**, 26033–6 (1995).
767. Plataniias, L. C., Uddin, S. & Colamonici, O. R. Tyrosine phosphorylation of the alpha and beta subunits of the type I interferon receptor. Interferon-beta selectively induces tyrosine phosphorylation of an alpha subunit-associated protein. *J. Biol. Chem.* **269**, 17761–4 (1994).
768. Krishnan, K., Yan, H., Lim, J. T. & Krolewski, J. J. Dimerization of a chimeric CD4-interferon-alpha receptor reconstitutes the signaling events preceding STAT phosphorylation. *Oncogene* **13**, 125–33 (1996).
769. Gauzzi, M. C. *et al.* The amino-terminal region of Tyk2 sustains the level of interferon alpha receptor 1, a component of the interferon alpha/beta receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 11839–44 (1997).
770. Heim, M. H., Kerr, I. M., Stark, G. R. & Darnell, J. E. Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. *Science* **267**, 1347–9 (1995).
771. Steen, H. C. & Gamero, A. M. STAT2 phosphorylation and signaling. *JAK-STAT* **2**, e25790 (2013).
772. Schindler, C., Shuai, K., Prezioso, V. R. & Darnell, J. E. Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science* **257**, 809–13 (1992).
773. Schoggins, J. W. *et al.* Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity. *Nature* **505**, 691–5 (2014).
774. Schoggins, J. W. *et al.* A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* **472**, 481–485 (2011).
775. Schoggins, J. W. Interferon-stimulated genes: roles in viral pathogenesis. *Curr. Opin. Virol.* **6**, 40–46 (2014).
776. Holzinger, D. *et al.* Induction of MxA gene expression by influenza A virus requires type I or type III interferon signaling. *J. Virol.* **81**, 7776–85 (2007).
777. Gao, S. *et al.* Structure of Myxovirus Resistance Protein A Reveals Intra- and Intermolecular Domain Interactions Required for the Antiviral Function. *Immunity* **35**, 514–525 (2011).
778. Verhelst, J., Hulpiau, P. & Saelens, X. Mx Proteins: Antiviral Gatekeepers That Restrain the Uninvited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **77**, 551–566 (2013).
779. Gao, S. *et al.* Structural basis of oligomerization in the stalk region of dynamin-like MxA. *Nature* **465**, 502–506 (2010).
780. Kochs, G. & Haller, O. GTP-bound human MxA protein interacts with the nucleocapsids of Thogoto virus (Orthomyxoviridae). *J. Biol. Chem.* **274**, 4370–6 (1999).
781. Verhelst, J., Parthoens, E., Schepens, B., Fiers, W. & Saelens, X. Interferon-inducible protein Mx1 inhibits influenza virus by interfering with functional viral ribonucleoprotein complex assembly. *J. Virol.* **86**, 13445–55 (2012).
782. Schneider-Schaulies, S. *et al.* Cell type-specific MxA-mediated inhibition of measles virus transcription in human brain cells. *J. Virol.* **68**, 6910–7 (1994).
783. Schnorr, J. J. *et al.* MxA-dependent inhibition of measles virus glycoprotein synthesis in a stably transfected human monocytic cell line. *J. Virol.* **67**, 4760–8 (1993).
784. Haller, O., Staeheli, P., Schwemmler, M. & Kochs, G. Mx GTPases: dynamin-like antiviral machines of innate immunity. *Trends Microbiol.* **23**, 154–163 (2015).

785. Kane, M. *et al.* MX2 is an interferon-induced inhibitor of HIV-1 infection. *Nature* **502**, 563–566 (2013).
786. Lu, J. *et al.* The IFITM Proteins Inhibit HIV-1 Infection. *J. Virol.* **85**, 2126–2137 (2011).
787. Diamond, M. S. & Farzan, M. The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 46–57 (2013).
788. Hui, D. J., Bhasker, C. R., Merrick, W. C. & Sen, G. C. Viral Stress-inducible Protein p56 Inhibits Translation by Blocking the Interaction of eIF3 with the Ternary Complex eIF2·GTP·Met-tRNA_i. *J. Biol. Chem.* **278**, 39477–39482 (2003).
789. Terenzi, F., Hui, D. J., Merrick, W. C. & Sen, G. C. Distinct Induction Patterns and Functions of Two Closely Related Interferon-inducible Human Genes, ISG54 and ISG56. *J. Biol. Chem.* **281**, 34064–34071 (2006).
790. Pichlmair, A. *et al.* IFIT1 is an antiviral protein that recognizes 5'-triphosphate RNA. *Nat. Immunol.* **12**, 624–630 (2011).
791. Fensterl, V. *et al.* Interferon-Induced Ifit2/ISG54 Protects Mice from Lethal VSV Neuropathogenesis. *PLoS Pathog.* **8**, e1002712 (2012).
792. Munir, M. & Berg, M. The multiple faces of protein kinase R in antiviral defense. *Virulence* **4**, 85–9 (2013).
793. McAllister, C. S., Taghavi, N. & Samuel, C. E. Protein Kinase PKR Amplification of Interferon β Induction Occurs through Initiation Factor eIF-2 α -mediated Translational Control. *J. Biol. Chem.* **287**, 36384–36392 (2012).
794. Schulz, O. *et al.* Protein Kinase R Contributes to Immunity against Specific Viruses by Regulating Interferon mRNA Integrity. *Cell Host Microbe* **7**, 354–361 (2010).
795. García, M. A. *et al.* Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 1032–60 (2006).
796. Silverman, R. H. Fascination with 2-5A-dependent RNase: a unique enzyme that functions in interferon action. *J. Interferon Res.* **14**, 101–4 (1994).
797. Malathi, K., Dong, B., Gale, M. & Silverman, R. H. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* **448**, 816–819 (2007).
798. Chakrabarti, A., Jha, B. K. & Silverman, R. H. New Insights into the Role of RNase L in Innate Immunity. *J. Interf. Cytokine Res.* **31**, 49–57 (2011).
799. Wang, X., Hinson, E. R. & Cresswell, P. The Interferon-Inducible Protein Viperin Inhibits Influenza Virus Release by Perturbing Lipid Rafts. *Cell Host Microbe* **2**, 96–105 (2007).
800. Helbig, K. J. *et al.* The antiviral protein viperin inhibits hepatitis C virus replication via interaction with nonstructural protein 5A. *Hepatology* **54**, 1506–1517 (2011).
801. Seo, J.-Y., Yaneva, R., Hinson, E. R. & Cresswell, P. Human Cytomegalovirus Directly Induces the Antiviral Protein Viperin to Enhance Infectivity. *Science (80-.)*. **332**, 1093–1097 (2011).
802. Swiecki, M., Omattage, N. S. & Brett, T. J. BST-2/tetherin: Structural biology, viral antagonism, and immunobiology of a potent host antiviral factor. *Mol. Immunol.* **54**, 132–139 (2013).
803. Larner, A. C., Chaudhuri, A. & Darnell, J. E. Transcriptional induction by interferon. New protein(s) determine the extent and length of the induction. *J. Biol. Chem.* **261**, 453–9 (1986).
804. Rönnblom, L. The type I interferon system in the etiopathogenesis of autoimmune diseases. *Ups. J. Med. Sci.* **116**, 227–237 (2011).
805. Coccia, E. M., Uzé, G. & Pellegrini, S. Negative regulation of type I interferon signaling: facts and mechanisms. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. **52**, 77–87 (2006).
806. Rogers, R. S., Horvath, C. M. & Matunis, M. J. SUMO Modification of STAT1 and Its Role in PIAS-mediated Inhibition of Gene Activation. *J. Biol. Chem.* **278**, 30091–30097 (2003).
807. Hong, X.-X. & Carmichael, G. G. Innate immunity in pluripotent human cells: attenuated response to interferon- β . *J. Biol. Chem.* **288**, 16196–205 (2013).
808. Malakhov, M. P., Malakhova, O. A., Kim, K. Il, Ritchie, K. J. & Zhang, D.-E. UBP43 (USP18) Specifically Removes ISG15 from Conjugated Proteins. *J. Biol. Chem.* **277**, 9976–9981 (2002).
809. François-Newton, V. *et al.* USP18-Based Negative Feedback Control Is Induced by Type I and Type III Interferons and Specifically Inactivates Interferon α Response. *PLoS One* **6**, e22200 (2011).
810. Wu, T. R. *et al.* SHP-2 is a dual-specificity phosphatase involved in Stat1 dephosphorylation at both tyrosine and serine residues in nuclei. *J. Biol. Chem.* **277**, 47572–80 (2002).
811. Irie-Sasaki, J. *et al.* CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptorsignalling. *Nature* **409**, 349–354 (2001).
812. Myers, M. P. *et al.* TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J. Biol. Chem.* **276**, 47771–4 (2001).
813. Valente, G. *et al.* Distribution of interferon- γ receptor in human tissues. *Eur. J. Immunol.* **22**, 2403–2412 (1992).

814. Fox, B. A., Sheppard, P. O. & O'Hara, P. J. The role of genomic data in the discovery, annotation and evolutionary interpretation of the interferon-lambda family. *PLoS One* **4**, e4933 (2009).
815. Prokunina-Olsson, L. *et al.* A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat. Genet.* **45**, 164–71 (2013).
816. Sheppard, P. *et al.* IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat. Immunol.* **4**, 63–68 (2003).
817. Bolen, C. R., Ding, S., Robek, M. D. & Kleinstein, S. H. Dynamic expression profiling of type I and type III interferon-stimulated hepatocytes reveals a stable hierarchy of gene expression. *Hepatology* **59**, 1262–72 (2014).
818. Lee, J. *et al.* TNF- α Induced by Hepatitis C Virus via TLR7 and TLR8 in Hepatocytes Supports Interferon Signaling via an Autocrine Mechanism. *PLOS Pathog.* **11**, e1004937 (2015).
819. Mestan, J., Brockhaus, M., Kirchner, H. & Jacobsen, H. Antiviral Activity of Tumour Necrosis Factor. Synergism with Interferons and Induction of Oligo-2',5'-adenylate Synthetase. *J. Gen. Virol.* **69**, 3113–3120 (1988).
820. Li, Y. *et al.* Role of p38alpha Map kinase in Type I interferon signaling. *J. Biol. Chem.* **279**, 970–9 (2004).
821. Sung, P. S. *et al.* Roles of unphosphorylated ISGF3 in HCV infection and interferon responsiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 10443–8 (2015).
822. Fink, K. & Grandvaux, N. STAT2 and IRF9. *JAK-STAT* **2**, e27521 (2013).
823. Fish, E. N. *et al.* Activation of a CrkL-stat5 signaling complex by type I interferons. *J. Biol. Chem.* **274**, 571–3 (1999).
824. Mossman, K. L. *et al.* Herpes simplex virus triggers and then disarms a host antiviral response. *J. Virol.* **75**, 750–8 (2001).
825. Nakaya, T. *et al.* Gene Induction Pathways Mediated by Distinct IRFs during Viral Infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**, 1150–1156 (2001).
826. Collins, S. E., Noyce, R. S. & Mossman, K. L. Innate cellular response to virus particle entry requires IRF3 but not virus replication. *J. Virol.* **78**, 1706–17 (2004).
827. Grandvaux, N. *et al.* Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes. *J. Virol.* **76**, 5532–9 (2002).
828. Noyce, R. S. *et al.* Membrane perturbation elicits an IRF3-dependent, interferon-independent antiviral response. *J. Virol.* **85**, 10926–31 (2011).
829. Hare, D. N. *et al.* Membrane Perturbation-Associated Ca²⁺ Signaling and Incoming Genome Sensing Are Required for the Host Response to Low-Level Enveloped Virus Particle Entry. *J. Virol.* **90**, 3018–3027 (2016).
830. Stirnweiss, A. *et al.* IFN Regulatory Factor-1 Bypasses IFN-Mediated Antiviral Effects through Viperin Gene Induction. *J. Immunol.* **184**, 5179–5185 (2010).
831. Harada, H. *et al.* Structure and regulation of the human interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 genes: implications for a gene network in the interferon system. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1500–9 (1994).
832. Xu, L. *et al.* IFN regulatory factor 1 restricts hepatitis E virus replication by activating STAT1 to induce antiviral IFN-stimulated genes. *FASEB J.* **30**, 3352–3367 (2016).
833. Wang, B. X., Rahbar, R. & Fish, E. N. Interferon: Current Status and Future Prospects in Cancer Therapy. *J. Interf. Cytokine Res.* **31**, 545–552 (2011).
834. Marozin, S. *et al.* Inhibition of the IFN- β Response in Hepatocellular Carcinoma by Alternative Spliced Isoform of IFN Regulatory Factor-3. *Mol. Ther.* **16**, 1789–1797 (2008).
835. Cairns, P., Tokino, K., Eby, Y. & Sidransky, D. Homozygous deletions of 9p21 in primary human bladder tumors detected by comparative multiplex polymerase chain reaction. *Cancer Res.* **54**, 1422–4 (1994).
836. Olopade, O. I. *et al.* Homozygous loss of the interferon genes defines the critical region on 9p that is deleted in lung cancers. *Cancer Res.* **53**, 2410–5 (1993).
837. Diaz, M. O. *et al.* Deletions of Interferon Genes in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **322**, 77–82 (1990).
838. Adámková, L., Soucková, K. & Kovářík, J. Transcription protein STAT1: biology and relation to cancer. *Folia Biol. (Praha)*. **53**, 1–6 (2007).
839. Saloura, V. *et al.* Evaluation of an Attenuated Vesicular Stomatitis Virus Vector Expressing Interferon- β for Use in Malignant Pleural Mesothelioma: Heterogeneity in Interferon Responsiveness Defines Potential Efficacy. *Hum. Gene Ther.* **21**, 51–64 (2010).
840. Audsley, M. D. & Moseley, G. W. Paramyxovirus evasion of innate immunity: Diverse strategies for common targets. *World J. Virol.* **2**, 57–70 (2013).
841. Andrejeva, J. *et al.* The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN- promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 17264–17269 (2004).

842. Parisien, J.-P. *et al.* A shared interface mediates paramyxovirus interference with antiviral RNA helicases MDA5 and LGP2. *J. Virol.* **83**, 7252–60 (2009).
843. Pfaller, C. K. & Conzelmann, K.-K. Measles virus V protein is a decoy substrate for IkappaB kinase alpha and prevents Toll-like receptor 7/9-mediated interferon induction. *J. Virol.* **82**, 12365–73 (2008).
844. Yokota, S. *et al.* Measles virus suppresses interferon-alpha signaling pathway: suppression of Jak1 phosphorylation and association of viral accessory proteins, C and V, with interferon-alpha receptor complex. *Virology* **306**, 135–46 (2003).
845. Caignard, G. *et al.* Measles virus V protein blocks Jak1-mediated phosphorylation of STAT1 to escape IFN-alpha/beta signaling. *Virology* **368**, 351–62 (2007).
846. Caignard, G. *et al.* Inhibition of IFN- α/β signaling by two discrete peptides within measles virus V protein that specifically bind STAT1 and STAT2. *Virology* **383**, 112–120 (2009).
847. Palosaari, H., Parisien, J.-P., Rodriguez, J. J., Ulane, C. M. & Horvath, C. M. STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. *J. Virol.* **77**, 7635–44 (2003).
848. Sparrer, K. M. J., Pfaller, C. K. & Conzelmann, K.-K. Measles virus C protein interferes with Beta interferon transcription in the nucleus. *J. Virol.* **86**, 796–805 (2012).
849. Takayama, I. *et al.* The nucleocapsid protein of measles virus blocks host interferon response. *Virology* **424**, 45–55 (2012).
850. Takeda, M. *et al.* Measles virus attenuation associated with transcriptional impediment and a few amino acid changes in the polymerase and accessory proteins. *J. Virol.* **72**, 8690–6 (1998).
851. Ohno, S., Ono, N., Takeda, M., Takeuchi, K. & Yanagi, Y. Dissection of measles virus V protein in relation to its ability to block alpha/beta interferon signal transduction. *J. Gen. Virol.* **85**, 2991–2999 (2004).
852. Shingai, M. *et al.* Differential type I IFN-inducing abilities of wild-type versus vaccine strains of measles virus. *J. Immunol.* **179**, 6123–33 (2007).
853. Moerdyk-Schauwecker, M. *et al.* Resistance of pancreatic cancer cells to oncolytic vesicular stomatitis virus: role of type I interferon signaling. *Virology* **436**, 221–34 (2013).
854. Stojdl, D. F. *et al.* VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* **4**, 263–75 (2003).
855. Naik, S. & Russell, S. J. Engineering oncolytic viruses to exploit tumor specific defects in innate immune signaling pathways. *Expert Opin. Biol. Ther.* **9**, 1163–1176 (2009).
856. Alcamí, A., Symons, J. A. & Smith, G. L. The vaccinia virus soluble alpha/beta interferon (IFN) receptor binds to the cell surface and protects cells from the antiviral effects of IFN. *J. Virol.* **74**, 11230–9 (2000).
857. Langland, J. O. & Jacobs, B. L. The role of the PKR-inhibitory genes, E3L and K3L, in determining vaccinia virus host range. *Virology* **299**, 133–41 (2002).
858. Macen, J. L. *et al.* Differential inhibition of the Fas- and granule-mediated cytolysis pathways by the orthopoxvirus cytokine response modifier A/SPI-2 and SPI-1 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 9108–13 (1996).
859. Msaouel, P., D. Iankov, I., Dispenzieri, A. & Galanis, E. Attenuated Oncolytic Measles Virus Strains as Cancer Therapeutics. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **13**, 1732–1741 (2012).
860. Robinson, S. & Galanis, E. Potential and clinical translation of oncolytic measles viruses. *Expert Opin. Biol. Ther.* **17**, 353–363 (2017).
861. Hamasaki, M. *et al.* Low homozygous/high heterozygous deletion status by p16 FISH correlates with a better prognostic group than high homozygous deletion status in malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer* **99**, 155–161 (2016).
862. Cheng, J. Q. *et al.* p16 Alterations and Deletion Mapping of 9p21–p22 in Malignant Mesothelioma. *Cancer Res.* **54**, (1994).
863. Holm, C. K. *et al.* Virus-cell fusion as a trigger of innate immunity dependent on the adaptor STING. *Nat. Immunol.* **13**, 737–43 (2012).
864. Xia, T., Konno, H., Ahn, J. & Barber, G. N. Deregulation of STING Signaling in Colorectal Carcinoma Constrains DNA Damage Responses and Correlates With Tumorigenesis. *Cell Rep.* **14**, 282–97 (2016).
865. Ahn, J., Ruiz, P. & Barber, G. N. Intrinsic self-DNA triggers inflammatory disease dependent on STING. *J. Immunol.* **193**, 4634–42 (2014).
866. Ahn, J. *et al.* Inflammation-driven carcinogenesis is mediated through STING. *Nat. Commun.* **5**, 5166 (2014).
867. Gonzalez-Cao, M. *et al.* Human endogenous retroviruses and cancer. *Cancer Biol. Med.* **13**, 483–488 (2016).
868. Ichimura, K., Schmidt, E. E., Yamaguchi, N., David James, C. & Peter Collins, V. A Common Region of Homozygous Deletion in Malignant Human Gliomas Lies between the IFN α/w Gene Cluster and the D9S171

- Locus'. *CANCER Res.* **54**, (1994).
869. Chen, Z. H., Zhang, H. & Savarese, T. M. Gene deletion chemoselectivity: codeletion of the genes for p16(INK4), methylthioadenosine phosphorylase, and the alpha- and beta-interferons in human pancreatic cell carcinoma lines and its implications for chemotherapy. *Cancer Res.* **56**, 1083–90 (1996).
870. Wollmann, G., Ozduman, K. & van den Pol, A. N. Oncolytic Virus Therapy for Glioblastoma Multiforme. *Cancer J.* **18**, 69–81 (2012).
871. Ye, Z. *et al.* Prevalent Homozygous Deletions of Type I Interferon and Defensin Genes in Human Cancers Associate with Immunotherapy Resistance. *Clin. Cancer Res.* (2018). doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-3008
872. Kurokawa, C. *et al.* Constitutive Interferon Pathway Activation in Tumors as an Efficacy Determinant Following Oncolytic Virotherapy. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* (2018). doi:10.1093/jnci/djy033
873. Pinto, A. K. *et al.* Deficient IFN Signaling by Myeloid Cells Leads to MAVS-Dependent Virus-Induced Sepsis. *PLoS Pathog.* **10**, e1004086 (2014).
874. Bidwell, B. N. *et al.* Silencing of Irf7 pathways in breast cancer cells promotes bone metastasis through immune escape. *Nat. Med.* **18**, 1224–1231 (2012).
875. Li, Q. & Tainsky, M. A. Epigenetic Silencing of IRF7 and/or IRF5 in Lung Cancer Cells Leads to Increased Sensitivity to Oncolytic Viruses. *PLoS One* **6**, e28683 (2011).
876. Yanai, H., Negishi, H. & Taniguchi, T. The IRF family of transcription factors. *Oncoimmunology* **1**, 1376–1386 (2012).
877. Kulaeva, O. I. *et al.* Epigenetic silencing of multiple interferon pathway genes after cellular immortalization. *Oncogene* **22**, 4118–4127 (2003).
878. Wong, L. H. *et al.* Interferon-resistant human melanoma cells are deficient in ISGF3 components, STAT1, STAT2, and p48-ISGF3gamma. *J. Biol. Chem.* **272**, 28779–85 (1997).
879. Sun, W. H. *et al.* Interferon-alpha resistance in a cutaneous T-cell lymphoma cell line is associated with lack of STAT1 expression. *Blood* **91**, 570–6 (1998).
880. Garg, A. D. *et al.* Trial watch: Immunogenic cell death induction by anticancer chemotherapeutics. *Oncoimmunology* **6**, e1386829 (2017).
881. Rao, R. V., Ellerby, H. M. & Bredesen, D. E. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ.* **11**, 372–380 (2004).
882. Guillerme, J. B. *et al.* Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Clin. Cancer Res.* **19**, 1147–1158 (2013).
883. Deauvieu, F. *et al.* Human natural killer cells promote cross-presentation of tumor cell-derived antigens by dendritic cells. *Int. J. Cancer* **136**, 1085–94 (2015).
884. Coffin, R. S. From virotherapy to oncolytic immunotherapy: where are we now? *Curr. Opin. Virol.* **13**, 93–100 (2015).
885. Xia, M. *et al.* Mitophagy switches cell death from apoptosis to necrosis in NSCLC cells treated with oncolytic measles virus. *Oncotarget* **5**, 3907–18 (2014).
886. Lozupone, F. & Fais, S. Cancer Cell Cannibalism: A Primeval Option to Survive. *Curr. Mol. Med.* **15**, 836–41 (2015).
887. Lugini, L. *et al.* Cannibalism of Live Lymphocytes by Human Metastatic but Not Primary Melanoma Cells. *Cancer Res.* **66**, 3629–3638 (2006).
888. Van Den Bossche, K., Naeyaert, J.-M. & Lambert, J. The Quest for the Mechanism of Melanin Transfer. *Traffic* **7**, 769–778 (2006).
889. Benlalam, H. *et al.* Gap Junction Communication between Autologous Endothelial and Tumor Cells Induce Cross-Recognition and Elimination by Specific CTL. *J. Immunol.* **182**, 2654–2664 (2009).
890. Vaughan, H. A. *et al.* Immunohistochemical and Molecular Analysis of Human Melanomas for Expression of the Human Cancer-Testis Antigens NY-ESO-1 and LAGE-1. *Clin. Cancer Res.* **10**, 8396–8404 (2004).
891. Robbins, P. F. *et al.* A Pilot Trial Using Lymphocytes Genetically Engineered with an NY-ESO-1-Reactive T-cell Receptor: Long-term Follow-up and Correlates with Response. *Clin. Cancer Res.* **21**, 1019–1027 (2015).
892. Hunder, N. N. *et al.* Treatment of Metastatic Melanoma with Autologous CD4+ T Cells against NY-ESO-1. *N. Engl. J. Med.* **358**, 2698–2703 (2008).
893. Zeng, G., Wang, X., Robbins, P. F., Rosenberg, S. A. & Wang, R. F. CD4(+) T cell recognition of MHC class II-restricted epitopes from NY-ESO-1 presented by a prevalent HLA DP4 allele: association with NY-ESO-1 antibody production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 3964–9 (2001).
894. Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., van der Bruggen, P. & Boon, T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 135–146 (2014).
895. Prestwich, R. J. *et al.* Tumor Infection by Oncolytic Reovirus Primes Adaptive Antitumor Immunity. *Clin. Cancer Res.* **14**, 7358–7366 (2008).

896. Joller, N. & Kuchroo, V. K. in *Current topics in microbiology and immunology* **410**, 127–156 (2017).

ANNEXES

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

Carole Achard^{1,2,3}, Nicolas Boisgerault^{1,2,3}, Tiphaine Delaunay^{1,2,3}, David Roulois^{1,2,3}, Steven Nedellec^{3,4}, Pierre-Joseph Royer^{3,5}, Mallory Pain^{3,5}, Chantal Combredet⁶, Mariana Mesel-Lemoine⁶, Laurent Cellierin⁷, Antoine Magnan^{3,5,8}, Frédéric Tangy⁶, Marc Grégoire^{1,2,3} and Jean-François Fonteneau^{1,2,3}

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

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

³ Université de Nantes, Nantes, France

⁴ INSERM UMS016, SFR Santé, Nantes, France

⁵ INSERM UMRS1087, Institut du Thorax, Nantes, France

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

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

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

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

Keywords: oncolytic virus, measles virus, oncolytic virotherapy, mesothelioma, type I interferon

Received: October 08, 2015

Accepted: October 22, 2015

Published: November 02, 2015

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

ABSTRACT

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

INTRODUCTION

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

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

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

mediated cytotoxicity [11, 12]. This expression at high density confers to attenuated MV a natural tropism for tumor cells. In fact, above a certain threshold of CD46 expression, the killing and syncytia formation mediated by MV infection increase dramatically [7]. Healthy cells that express a low level of CD46 are not infected [13]. Recently, nectin-4 has been described as a receptor for attenuated and wild-type MV, but its implication in the oncolytic activity of MV is still to be determined [14, 15].

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

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

RESULTS

Sensitivity of MPM and healthy primary cells to MV infection

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

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

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

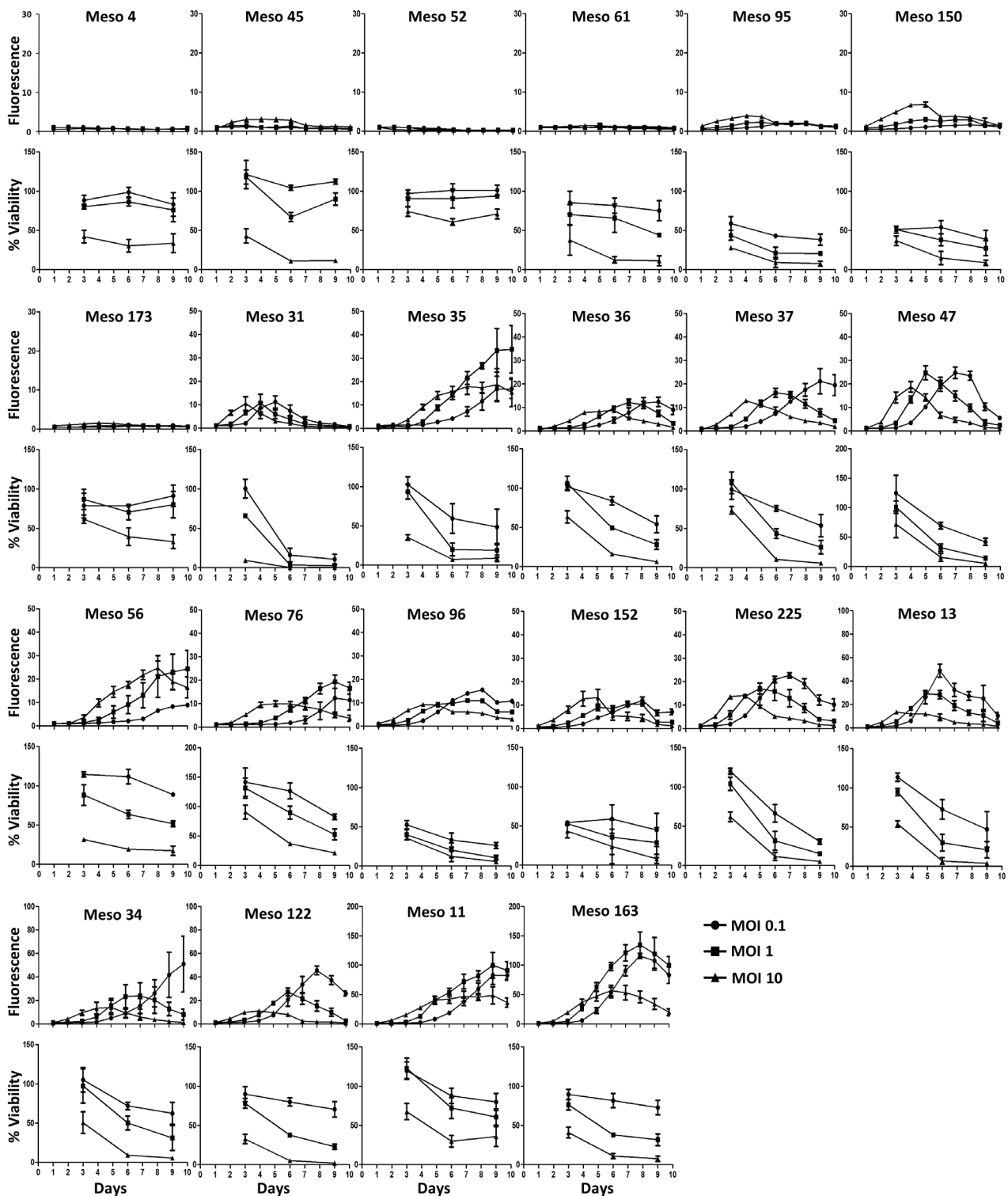


Figure 1: A majority of MPM tumor cell lines are sensitive to MV replication and oncolytic activity. MPM cell lines were infected with MV-ch or MV at different MOI: 0.1 (circles), 1 (squares) and 10 (triangles). MV-ch and MV were used for the MV replication assay and the cell viability assay, respectively.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

these primary cells decreased, especially at the highest MOI.

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

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

MV uses CD46 to infect MPM tumor cells

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

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

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

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

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

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

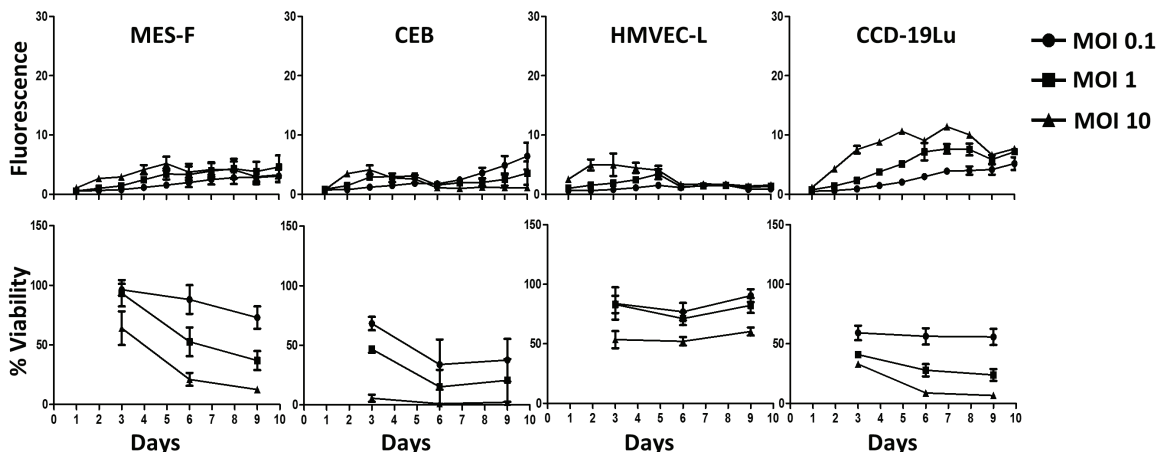


Figure 2: Healthy cells are not sensitive to MV replication. 4 types of healthy cells (mesothelial cells MES-F, bronchial epithelial cells CEB, pulmonary endothelial cells HMVEC-L and pulmonary fibroblasts CCD-19Lu) were infected with MV-ch or MV at different MOI: 0.1 (circles), 1 (squares) and 10 (triangles).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

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

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

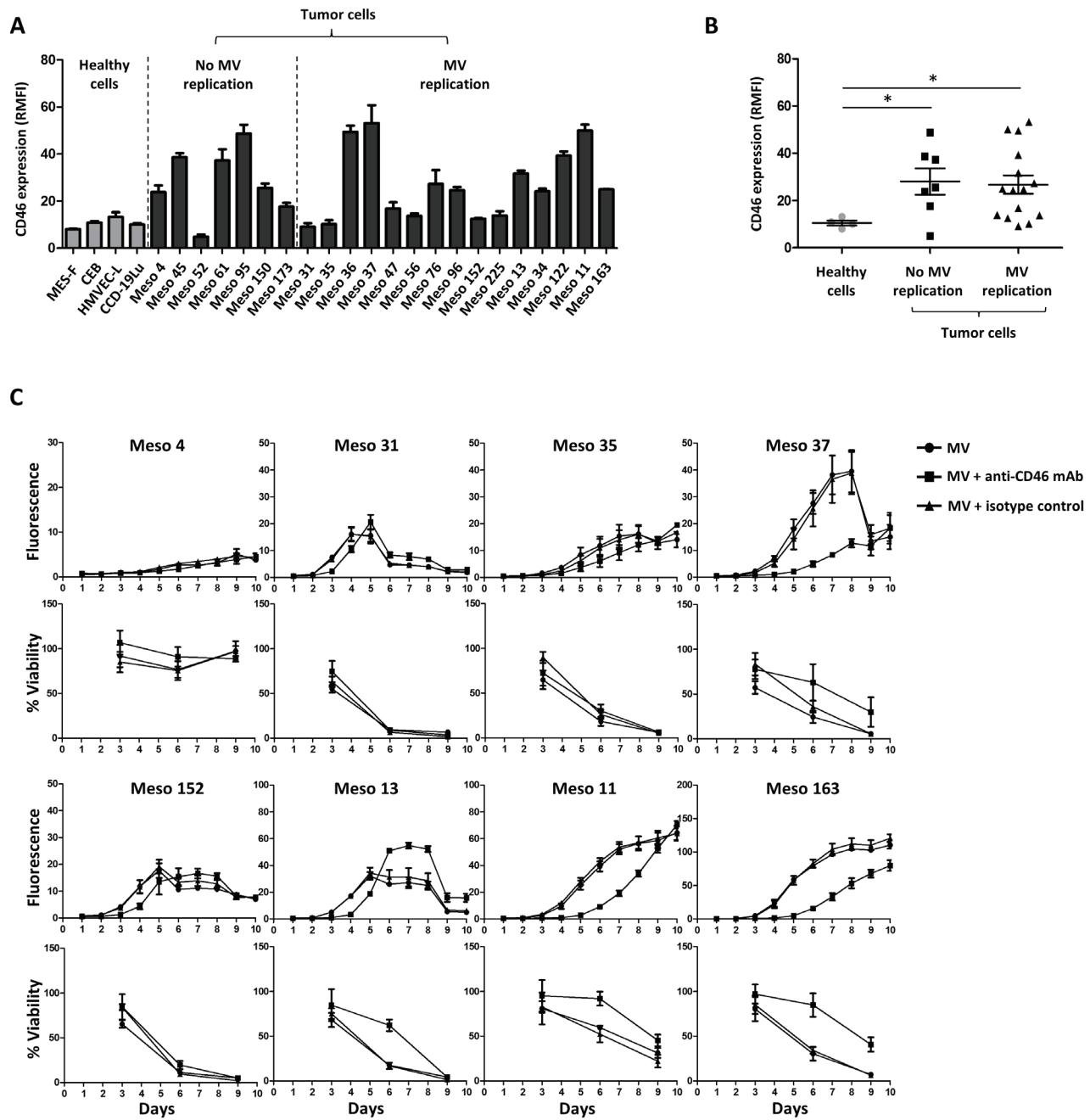


Figure 3: Absence of correlation between CD46 surface expression and MPM sensitivity to MV replication. (A) Expression of CD46 is measured on the cell surface by flow cytometry. Results are expressed as RMFI ± SEM of three independent experiments. (B) Scatter plot representation of the CD46 expression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

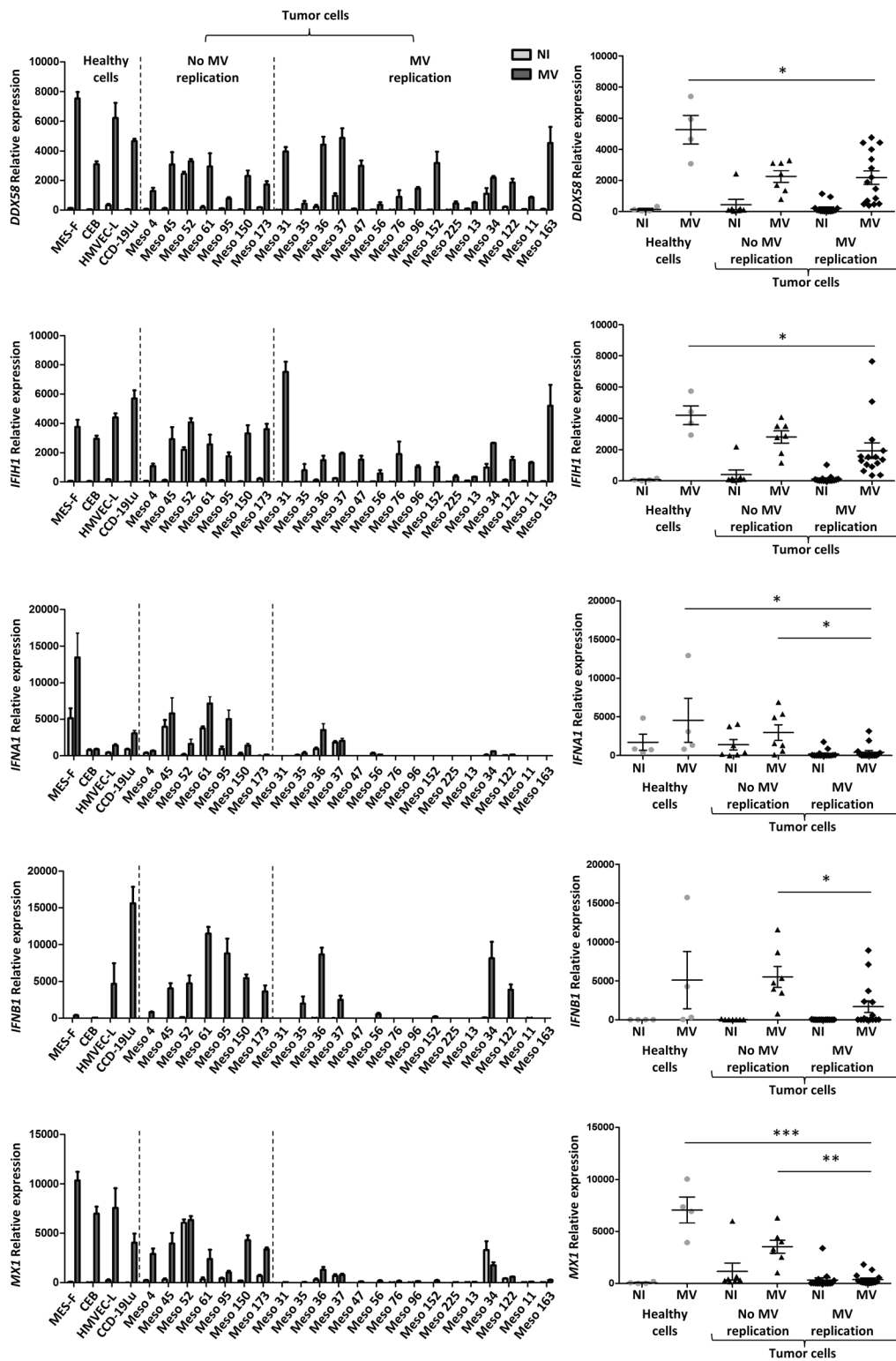


Figure 4: The sensitivity to MV infection depends on defects of the antiviral type I IFN response. The expression of five genes implicated in the antiviral type I IFN response was analyzed by RT-qPCR 72 hours after MV infection of tumor and healthy cells (MOI = 1). The expression is expressed as relative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

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

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

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

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

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

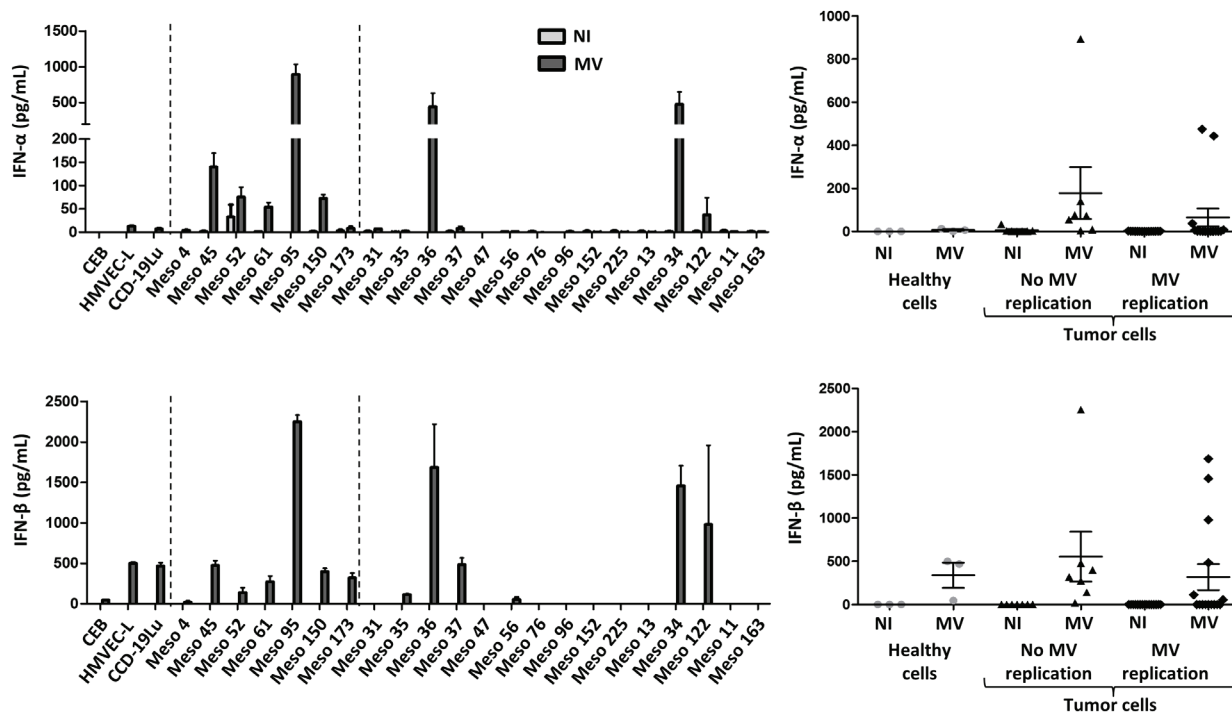


Figure 5: Secretion of the type I IFN, IFN- α and IFN- β , after MV infection. IFN- α and IFN- β secretion was measured by ELISA, 72 hours after MV infection of tumor and healthy cells (MOI = 1). Non-infected cells (NI) are in light gray and infected cells (MV) are in dark gray. For each IFN, a histogram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

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

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

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

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

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

DISCUSSION

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

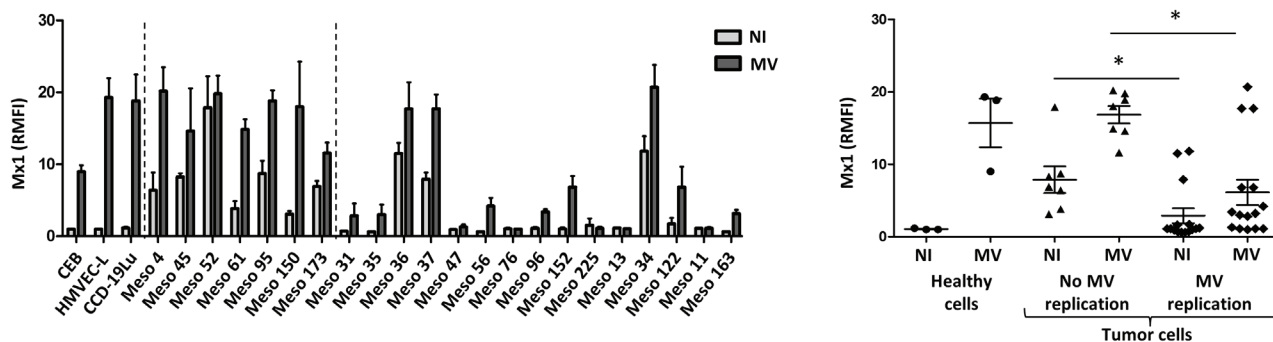


Figure 6: Sensitivity to MV replication correlates with the absence of expression of the antiviral protein Mx1. Intracytoplasmic Mx1 staining was performed on non-infected (NI) or on MV-infected tumor cells (MOI = 1, 72h) and fluorescence was analyzed by flow cytometry. The histogram represents the expression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

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

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

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

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

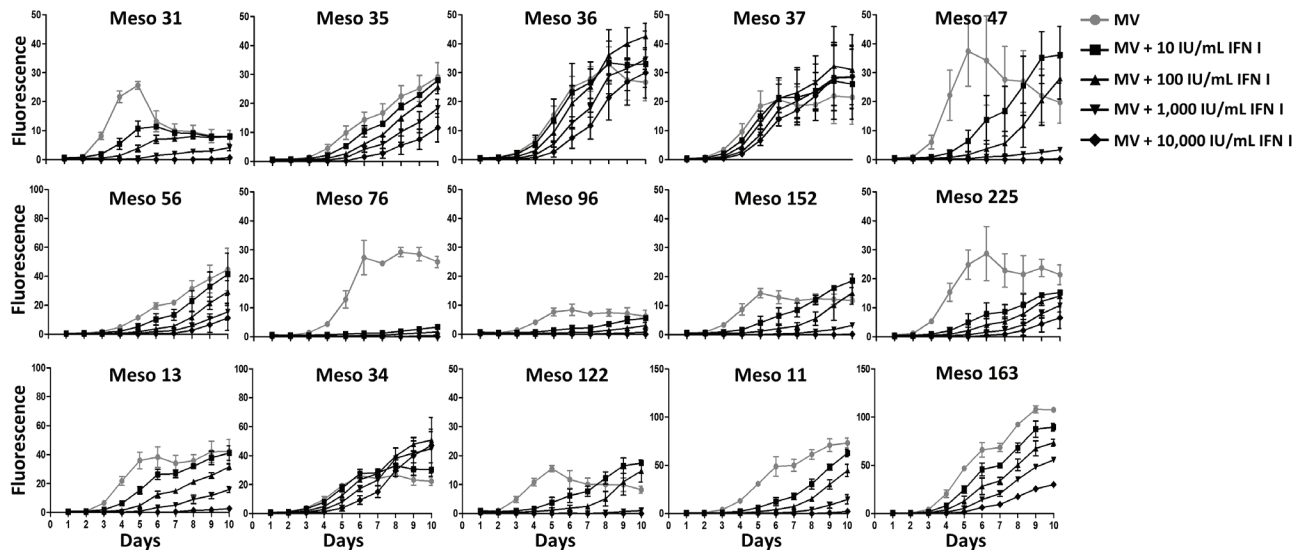


Figure 7: Type I IFN inhibit MV replication in the majority of MV-sensitive tumor cell lines. MPM cell lines were infected with MV-ch (MOI = 1) in the presence of different amounts of IFN I (IFN- α and IFN- β) for MV replication assay. The fluorescence values correspond to the ratio between the fluorescence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

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

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

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

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

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

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

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

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

MV infection

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

MV replication assay

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

Cell viability assay

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

Video microscopy

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

Flow cytometry

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

Real-time RT-qPCR

MPM cell lines and healthy cells were seeded in 6-well plates at a density of 0.5x10⁶ cells/well and infected with MV at MOI = 1. 72 hours after infection, total cell RNA was extracted using the Nucleospin® RNA II kit (Macherey-Nagel) and 0.5µg total RNA was reverse transcribed using MMLV reverse transcriptase (Invitrogen). PCR reactions were conducted using QuantiTect primer assays (Qiagen) and Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Gene expression was analyzed in non-infected and infected cells using QuantiTect primers pairs for *IFNA1* (coding for IFN-α), *IFNB1* (IFN-β), *IFNL1* (IFN-λ1), *Mx1* (Mx1), *DDX58* (RIG-I) and *IFIH1* (MDA5). The gene expression was expressed as relative expression compared to the expression of a housekeeping gene that encodes human large ribosomal protein (RPLPO).

Cytokine detection

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

Statistical analysis

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

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

ACKNOWLEDGEMENTS

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

CONFLICTS OF INTEREST

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

Editorial note

This paper has been accepted based in part on peer-review conducted by another journal and the authors' response and revisions as well as expedited peer-review in Oncotarget.

REFERENCES

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

- Mayer N, Malek NP, Bitzer M and Lauer UM. Innate immune defense defines susceptibility of sarcoma cells to measles vaccine virus-based oncolysis. *J Virol.* 2013; 87:3484-3501.
19. Schneider WM, Chevillotte MD and Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol.* 2014; 32:513-545.
 20. Mitchell PS, Emerman M and Malik HS. An evolutionary perspective on the broad antiviral specificity of MxA. *Curr Opin Microbiol.* 2013; 16:493-499.
 21. Gauvrit A, Brandler S, Sapede-Peroz C, Boisgerault N, Tangy F and Gregoire M. Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response. *Cancer Res.* 2008; 68:4882-4892.
 22. Guillerme JB, Boisgerault N, Roulois D, Menager J, Combredet C, Tangy F, Fonteneau JF and Gregoire M. Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Clin Cancer Res.* 2013; 19:1147-1158.
 23. Gueugnon F, Leclercq S, Blanquart C, Sagan C, Cellierin L, Padiou M, Perigaud C, Scherpereel A and Gregoire M. Identification of novel markers for the diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Am J Pathol.* 2011; 178:1033-1042.
 24. Erlenhofer C, Duprex WP, Rima BK, ter Meulen V and Schneider-Schaulies J. Analysis of receptor (CD46, CD150) usage by measles virus. *J Gen Virol.* 2002; 83:1431-1436.
 25. Runge S, Sparrer KM, Lassig C, Hembach K, Baum A, Garcia-Sastre A, Soding J, Conzelmann KK and Hopfner KP. *in vivo* ligands of MDA5 and RIG-I in measles virus-infected cells. *PLoS Pathog.* 2014; 10:e1004081.
 26. Diamond MS, Kinder M, Matsushita H, Mashayekhi M, Dunn GP, Archambault JM, Lee H, Arthur CD, White JM, Kalinke U, Murphy KM and Schreiber RD. Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J Exp Med.* 2011; 208:1989-2003.
 27. Fuertes MB, Kacha AK, Kline J, Woo SR, Kranz DM, Murphy KM and Gajewski TF. Host type I IFN signals are required for antitumor CD8⁺ T cell responses through CD8 α ⁺ dendritic cells. *J Exp Med.* 2011; 208:2005-2016.
 28. Lenci RE, Bevier M, Brandt A, Bermejo JL, Sucker A, Moll I, Planelles D, Requena C, Nagore E, Hemminki K, Schadendorf D and Kumar R. Influence of genetic variants in type I interferon genes on melanoma survival and therapy. *PLoS One.* 2012; 7:e50692.
 29. Pavlovic J, Arzet HA, Hefti HP, Frese M, Rost D, Ernst B, Kolb E, Stacheli P and Haller O. Enhanced virus resistance of transgenic mice expressing the human MxA protein. *J Virol.* 1995; 69:4506-4510.
 30. Schneider-Schaulies S, Schneider-Schaulies J, Schuster A, Bayer M, Pavlovic J and ter Meulen V. Cell type-specific MxA-mediated inhibition of measles virus transcription in human brain cells. *J Virol.* 1994; 68:6910-6917.
 31. Schoggins JW, MacDuff DA, Imanaka N, Gainey MD, Shrestha B, Eitson JL, Mar KB, Richardson RB, Ratushny AV, Litvak V, Dabelic R, Manicassamy B, Aitchison JD, Aderem A, Elliott RM, Garcia-Sastre A, et al. Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for eGAS in innate immunity. *Nature.* 2014; 505:691-695.
 32. Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P and Rice CM. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature.* 2011; 472:481-485.
 33. Boisgerault N, Guillerme JB, Pouliquen D, Mesel-Lemoine M, Achard C, Combredet C, Fonteneau JF, Tangy F and Gregoire M. Natural oncolytic activity of live-attenuated measles virus against human lung and colorectal adenocarcinomas. *Biomed Int Res.* 2013; 2013:387362.
 34. Russell SJ, Federspiel MJ, Peng KW, Tong C, Dingli D, Morice WG, Lowe V, O'Connor MK, Kyle RA, Leung N, Buadi FK, Rajkumar SV, Gertz MA, Lacy MQ and Dispenzieri A. Remission of Disseminated Cancer After Systemic Oncolytic Virotherapy. *Mayo Clin Proc.* 2014; 89:926-933.
 35. Hackett TL, Warner SM, Stefanowicz D, Shaheen F, Pechkovsky DV, Murray LA, Argentieri R, Kicic A, Stick SM, Bai TR and Knight DA. Induction of epithelial-mesenchymal transition in primary airway epithelial cells from patients with asthma by transforming growth factor-beta1. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009; 180:122-133.
 36. Combredet C, Labrousse V, Mollet L, Lorin C, Delebecque F, Hurtrel B, McClure H, Feinberg MB, Brahic M and Tangy F. A molecularly cloned Schwarz strain of measles virus vaccine induces strong immune responses in macaques and transgenic mice. *J Virol.* 2003; 77:11546-11554.

Induction of Immunogenic Tumor Cell Death by Attenuated Oncolytic Measles Virus

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

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

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

³Université de Nantes, Nantes, France

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

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

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

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

Abstract

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

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

Introduction

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

Attenuated MV as an Oncolytic Virus

Structure and replication cycle of MV

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

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

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

Oncolytic activity of MV

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

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

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

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

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

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

Clinical trials with oncolytic MV

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

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

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

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

Immunogenic Cell Death (ICD)

Discovery of ICD

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

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

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

Inducers and types of ICD

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

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

DAMPs and ICD

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

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

Oncolytic Measles Viruses and The Induction Of Tumor ICD

Evidence of ICD induction by MV from clinical trials

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

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

Interaction of MV infected tumor cells and dendritic cells

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

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

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

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

The type of ICD induced by MV

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

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

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

Conclusion

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

Acknowledgement

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

References

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

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

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

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

Oncolytic virotherapy for human malignant mesothelioma: recent advances

Nicolas Boisgerault¹⁻³
Carole Achard¹⁻³
Tiphaine Delaunay¹⁻³
Laurent Cellerin⁴
Frédéric Tangy⁵
Marc Grégoire¹⁻³
Jean-François Fonteneau¹⁻³

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

Correspondence: Nicolas Boisgerault
INSERM, UMR892 - CNRS UMR6299,
Institut de Recherche Thérapeutique de
l'Université de Nantes, 8 quai Moncoussu,
BP70721, 44007 Nantes Cedex 1, France
Tel +33 2 2808 0236
Fax +33 2 2808 0204
Email nicolas.boisgerault@inserm.fr

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

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

Introduction

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

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

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

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

Malignant mesothelioma

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

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

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

Herpesvirus

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

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

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

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

Poxvirus

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

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

Table 1 Completed and ongoing clinical trials of virotherapy for malignant mesothelioma treatment

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

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

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

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

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

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

Adenovirus

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

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

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

RNA viruses

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

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

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

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

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

Antitumor immune responses

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

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

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

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

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

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

Treatment combinations

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

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

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

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

Conclusion

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

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

Acknowledgments

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

Disclosure

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

References

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

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

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

Oncolytic Virotherapy

Publish your work in this journal

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

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

Dovepress

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

Annexe n°4 : Présentations orales réalisées au cours de la thèse à des congrès nationaux et internationaux

- 1) International meeting on replicating oncolytic virus therapeutics (Vancouver, October 2016) - **Travel Awards.**

Tiphaine Delaunay, Mathilde Violland, Brigitte Dréno, Nathalie Labarrière, Philippe Erbs, Frédéric Tangy, Marc Grégoire, and Jean-François Fonteneau.

Oncolytic viruses sensitize tumor cells for NYESO-1 tumor antigen recognition by CD4+ effector T cells.

- 2) 10th days of Cancéropôle Grand Ouest (Sables d'Olonne, June 2016) - **1st Prize communication.**

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

La sensibilité du mésothéliome pleural malin au virus atténué oncolytique de la rougeole dépend de défauts de la réponse interféron de type I.

- 3) 4th European Seminar in Virology, Oncogenic and Oncolytic Viruses (Bologna, June 2016) - **Travel grant.**

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

Sensitivity of pleural mesothelioma to oncolytic measles virus depends on defects of the type I IFN response.

Annexe n°5 : Présentations posters réalisées au cours de la thèse à des congrès nationaux et internationaux.

- 1) 11th International Oncolytic Virus Conference (Oxford, April 2018)

Tiphaine Delaunay, Carole Achard, Nicolas Boisgerault, Soizic Dutoit, Pierre-Joseph Royer, Chantal Combredet, Stéphane Minvielle, Laurent Cellerin, Frédéric Tangy, Marc Grégoire and Jean-François Fonteneau.

Induction of inflammatory cell death by oncolytic MV in human mesothelioma cells deleted of type I interferon genes.

- 2) 3rd International Cancer Symposium CRCL, (Lyon, November 2017) - **2nd Poster teaser prize.**

Tiphaine Delaunay, Carole Achard, Nicolas Boisgerault, Soizic Dutoit, Pierre-Joseph Royer, Chantal Combredet, Stéphane Minvielle, Laurent Cellerin, Frédéric Tangy, Marc Grégoire and Jean-François Fonteneau.

Partial antiviral response by mesothelioma cells sensitive to the oncolytic activity of measles virus defines two types of interferon stimulated genes.

- 3) 3rd International Cancer Symposium CRCL, (Lyon, November 2017)

Tiphaine Delaunay, Mathilde Violland, Nicolas Boisgerault, Virginie Vignard, Brigitte Dréno, Kristina Vaivode, Dace Pjanova, Nathalie Labarrière, Yahoe Wang, E. Antonio Chiocca, John C. Bell, Philippe Erbs, Frédéric Tangy, Marc Grégoire, and Jean-François Fonteneau.

Oncolytic viruses sensitize human tumor cells for ny-eso-1 tumor antigen recognition by cd4+ effector t cells.

- 4) International meeting on replicating oncolytic virus therapeutics (Vancouver, October 2016) - **Travel Awards.**

Tiphaine Delaunay, Carole Achard, Nicolas Boisgerault, Pierre-Joseph Royer, Chantal Combredet, Laurent Cellerin, Frédéric Tangy, Marc Grégoire and Jean-François Fonteneau.

Sensitivity of pleural mesothelioma to oncolytic measles virus depends on defects of the type I IFN response.

- 5) 4th European Seminar in Virology, Oncogenic and Oncolytic Viruses (EuSeV) (Bologna, June 2016).

Tiphaine Delaunay, Mathilde Violland, Brigitte Dréno, Nathalie Labarrière, Frédéric Tangy, Marc Grégoire, and Jean-François Fonteneau

Oncolytic measles virus sensitize tumor cells for NYESO-1 tumor antigen recognition by CD4+ effector T cells.

- 6) IGO Congress SUMMER MEETING - Immunotherapy Graft – Oncology (Nantes, April 2017).

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

Sensitivity of pleural mesothelioma to oncolytic Measles virus depends on defects of the type I IFN response.

- 7) Scientific Days of the Nantes-Angers Graduate School of Biology (Nantes, December 2015) - **3rd prize poster.**

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

Oncolytic activity of Schwarz Measles Virus against human pleural mesothelioma.

Titre : Étude de différents virus oncolytiques pour l'immunothérapie du cancer: Mécanismes de la sensibilité tumorale et effets sur la réponse immunitaire.

Mots clés : Immunothérapie, virus oncolytique, réponse interféron de type I, réponse immunitaire antitumorale, Mésothéliome Pleural Malin.

Resumé : L'immunothérapie oncolytique exploite les propriétés lytiques et immunogènes des virus oncolytiques (OV). Ces virus répliquent et lysent sélectivement les cellules tumorales sans nuire aux tissus sains. Au cours de ma thèse, j'ai identifié la délétion bi-allélique des gènes codant les interférons de type I (IFN I, IFN- α et - β) comme étant le défaut le plus fréquent de la réponse antivirale IFN I dans le mésothéliome pleural malin (MPM). Ces altérations rendent les cellules tumorales permissives au virus atténué oncolytique de la rougeole. J'ai aussi montré que cette perte des gènes des IFN I est fréquente dans les cancers où la délétion du gène suppresseur de tumeur *CDKN2A* est impliquée (glioblastome, cancer de l'œsophage). Nous sommes donc les premiers à établir le lien entre les délétions des gènes des IFN I et la sensibilité des cellules tumorales à un OV. Ce

lien pourrait probablement servir de marqueur prédictif de l'efficacité de l'immunothérapie oncolytique. J'ai ensuite évalué la forte activité oncolytique *in vitro* et *in vivo* contre le MPM du virus de la vaccine modifié VVTK-RR- délété des gènes codant la thymidine kinase et la ribonucléotide réductase afin d'assurer sa spécificité. Enfin, j'ai démontré un nouveau mécanisme de stimulation de la réponse immunitaire anti-tumorale humaine par différents OV. En effet, en lysant les cellules tumorales, les OV provoquent le transfert intercellulaire d'antigènes tumoraux tels que NY-ESO-1 qui induit ou renforce la présentation de ces antigènes à des lymphocytes T CD4+ cytotoxiques spécifiques. Dans l'ensemble, mes travaux de thèse permettent une meilleure compréhension de l'activité oncolytique de différents virus et de leurs effets sur la réponse immunitaire anti-tumorale.

Title: Title: Study of different oncolytic viruses for cancer immunotherapy: Mechanisms of tumor sensitivity and effects on the immune response.

Keywords: Immunotherapy, oncolytic viruses, type I interferon response, antitumor immune response, Malignant Pleural Mesothelioma.

Abstract: Oncolytic immunotherapy exploits the lytic and immunogenic properties of oncolytic viruses (OV). These viruses selectively replicate in and lyse tumor cells without harming healthy tissues. During my thesis, I first identified the bi-allelic deletion of genes encoding type I interferons (IFN I, IFN- α and - β) as the most frequent defect in the IFN I antiviral response in malignant pleural mesothelioma (MPM). These alterations make the tumor cells permissive to attenuated oncolytic measles virus that subsequently provokes their lysis. I also showed that this loss of IFN I genes is common to cancers for which the deletion of the tumor suppressor gene *CDKN2A* is critical (glioblastoma, esophageal cancer). This is the first report showing a link between the deletion of IFN I genes and the sensitivity of tumor cells to OV. This link could

be used as a predictive marker of the efficacy of oncolytic immunotherapy. I then demonstrated *in vitro* and *in vivo* a strong oncolytic activity against MPM of the VVTK-RR- modified vaccinia virus deleted from the genes encoding the thymidine kinase and the ribonucleotide reductase. This OV is thus of particular interest for oncolytic immunotherapy of MPM. Finally, I demonstrated a new mechanism by which different OV favor the human anti-tumor immune response. By lysing tumor cells, OV allow the intercellular transfer of tumor-associated antigens such as NY-ESO-1 and induce or reinforce the presentation of these antigens to specific cytotoxic CD4+ T cells. Overall, my PhD work provides a better understanding of both the oncolytic activity of different viruses and their effects on the anti-tumor immune response.