

Thèse de Doctorat

Ferdaous ALLAGUI

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire
et l'Université De Tunis El Manar*

École doctorale : *Biologie-Santé*

Discipline : *Biologie, Médecine et Santé*

Spécialité : *Immunologie*

Unité de recherche : *INSERM UMR892/CNRS UMR6299*

Soutenue le *9 Janvier 2017*

Thèse N° :

Utilisation du vaccin de la rougeole dans le traitement des cancers résistants aux traitements usuels : modèle du mélanome

JURY

Président : **Marie-Dominique GALIBERT**, PU-PH, Université de Rennes
Rapporteur : **Makram ESSAFI**, Maître de conférences, Institut Pasteur de Tunis

Directeur de Thèse : **Marc GREGOIRE**, Directeur de recherche, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers

Co-directeur de Thèse : **Amel BENAMMAR ELGAAIED**, Professeur, Université de Tunis El Manar

Remerciements

Je tiens, tout d'abord, à remercier les membres rapporteurs du jury, le Pr. Marie-Dominique GALIBERT et le Dr. Makram ESSAFI qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse et de participer au jury de thèse. Je les remercie bien pour le temps passé à la lecture et pour l'intérêt porté à mon travail.

Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre d'une cotutelle de thèse entre l'Université de Nantes et l'Université de Tunis El-Manar au sein du laboratoire de Mort cellulaire immunogénique appliquée aux traitements du mésothéliome au centre de recherche en cancérologie Nantes-Angers et du laboratoire de Génétique, Immunologie et Pathologies Humaines à Tunis. Je tiens à remercier vivement le Ministère Tunisien de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique et l'institut français de coopération de Tunis de leurs prises en charge pour effectuer les différents séjours en France.

Je remercie mon directeur de thèse, Dr Marc GREGOIRE, directeur de l'équipe 4 et également mon directeur de thèse, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour la confiance qu'il m'a témoignée en me permettant de réaliser ma thèse dans son laboratoire. J'ai énormément appris au cours de ces 3 dernières années tant que sur le plan professionnel qu'humain. Merci pour ta disponibilité et tes conseils avisés dès que besoin, pour ta gentillesse et ton humanité...Merci pour tout !

Je remercie également ma co-directrice de thèse, Pr Amel BENAMMAR ELGAAIED, Professeur à l'Université de Tunis El-Manar pour avoir accepté de diriger cette thèse en me donnant de nombreux conseils et suggestions qui ont permis de mener à bien ce travail. Merci pour ton écoute et ta gentillesse.

Un grand Merci à Nicolas Boisgerault pour son aide précieuse, pour avoir partagé ses connaissances scientifiques et son expérience dans ce domaine. Merci pour tes conseils, ton aide pour la rédaction de l'article et pour la relecture du manuscrit, ta bonne humeur et ta positivité. Je te souhaite plein de succès dans ta carrière de chercheur.

Je souhaite également remercier Sophie pour son aide et sa gentillesse, et Daniel pour son aide dans la mise en place des expérimentations animales.

Mes remerciements vont également à tous les membres de l'équipe 4: Christophe, Jean François, Joëlle, Douae, Nadège, Thibault, Virginie, Camille.

Je remercie également la plateforme DTC : Delphine, Nina, Anne claire.

Je remercie également, la Plate-forme MicroPICell, en particulier Philippe Hulin pour la microscopie.

Le plus important à mes yeux, Merci mille fois du fond du cœur à ma famille. Mes sœurs : Kaouther, Besma et Feten et frères : Yassine et Anis, et mes parents adorés Souad et Amor: vous m'avez tout donné. Sans vous, je ne suis rien. Merci pour tout.

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS.....	1
LISTE DES ILLUSTRATIONS	4
INTRODUCTION	5
PARTIE I : Le Mélanome.....	6
I. Généralités	6
II. Les facteurs de risques	7
1. Expositions aux ultraviolets (UV)	7
2. Antécédents familiaux	8
III. Description de la pathologie et développement tumoral	8
1. La progression tumorale : des mélanocytes au mélanome	9
2. Les gènes impliqués dans le mélanome.....	11
IV. Les traitements actuels	13
1. La chirurgie.....	14
2. L'immunothérapie	14
3. La chimiothérapie	15
4. La radiothérapie	15
5. Nouvelles modalités thérapeutiques	15
a) Les inhibiteurs de BRAF.....	16
b) Le blocage des points de contrôle	16
c) Les virus oncolytiques	17
PARTIE II : La virothérapie antitumorale	19
I. Principe	19
II. Types de virus oncolytiques.....	20
1. Les herpès virus	21
2. Les adénovirus	23
3. Le virus de la vaccine	24
4. Les réovirus	25
5. Le virus de la maladie de Newcastle (NDV)	25
6. Le virus de la stomatite vésiculaire (VSV).....	26
III. Mécanismes d'action des virus oncolytiques	26
1. Oncolyse naturelle	26
a) Entrée spécifique des virus dans les cellules tumorales.....	27
b) Réplication sélective des virus dans les cellules tumorales	28
i. Voie de signalisation p53	28
ii. Voie de signalisation de l'interféron	29
iii. Voie de signalisation de la protéine kinase R.....	29
iv. Voie de signalisation Ras	30
2. Induction d'une réponse immunitaire anti tumorale.....	30

IV.	Essais cliniques des virus oncolytiques.....	32
1.	Le virus herpès simplex T-Vec.....	34
2.	L'adénovirus H101.....	36
3.	Reolysin.....	37
4.	Le virus de la vaccine JX-594.....	37
Partie III.	Le virus de la rougeole.....	39
I.	Description de la maladie.....	39
II.	Les différentes souches du virus de la rougeole.....	41
III.	Structure du virus et cycle de réplication.....	42
IV.	Récepteurs cellulaires du virus de la rougeole.....	44
1.	La molécule CD46 (membrane cofactor protein ou MCP).....	45
2.	La molécule CD150/ SLAM.....	46
3.	La Nectin-4.....	46
V.	Utilisation du virus de la rougeole atténué comme virus oncolytique.....	47
1.	Ciblage spécifiques des cellules tumorales.....	48
a)	Surexpression des récepteurs.....	48
b)	Défauts de la réponse IFN de type I.....	48
2.	Essais précliniques.....	49
3.	Modifications génétiques du virus de la rougeole.....	50
a)	Amélioration de l'activité lytique.....	50
b)	Combinaisons thérapeutiques.....	51
i.	La chimiothérapie.....	51
ii.	La radiothérapie.....	52
c)	Amélioration de l'immunogénicité.....	53
d)	Amélioration du tropisme du MV.....	55
e)	Amélioration de la traçabilité.....	57
4.	Essais cliniques.....	59
a)	Essai clinique de phase I : Lymphome cutané à cellules T.....	61
b)	Essai clinique de phase I : Cancer ovarien chimio-résistant.....	61
c)	Essai clinique de phase I : Myélome.....	62
d)	Essais cliniques en cours.....	63
5.	Considérations cliniques pour l'utilisation du virus de la rougeole.....	63
a)	L'immunité humorale.....	64
b)	Le système réticulo-endothélial.....	64
c)	Surmonter l'immunité antivirale contre le MV.....	64
i.	Immunosuppression.....	64
ii.	Utilisation des transporteurs cellulaires.....	65
PARTIE IV.	La réponse interféron de type I.....	68
I.	La détection des virus à ARN par la cellule hôte.....	68
1.	Senseurs des signaux de danger extérieurs : les TLRs.....	69
2.	Senseurs des signaux de dangers cytoplasmiques: les RLR.....	69
II.	Activation de la réponse IFN de type 1.....	71

III. Echappement du virus de la rougeole à la réponse interféron de type I.....	74
IV. Réponse interféron de type I et virothérapie	75
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	80
RÉSULTATS.....	83
Article: "Modulation of the type I interferon response influences the sensitivity of human melanoma cells to oncolytic measles virus"	84
DISCUSSION.....	98
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	110
BIBLIOGRAPHIE	112
Résumé	113
Abstract	113

LISTE DES ABREVIATIONS

5-FC: 5-fluorocytosine

5-FU: 5-fluorouracil

5-FUMP: 5-fluorouridine-5'-monophosphate

ADN : Acide désoxyribonucléiques

ADAR-1: Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase

ARNm : ARN messenger

ATL: Adult T cell Leukemia

ATP: Adénosine Triphosphate

BRCA1: breast cancer 1

CAR: coxsackie and adenovirus receptor

CARD: Caspase Activation and Recruitment Domain

CD : Cluster de différenciation

CDC: Complement-Dependent Cytotoxicity

CDKN2: cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2A

CDK4: cyclin-Dependent Kinase

CEA: CarcinoEmbryonic Antigen

CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CpG: 2'-deoxyribo-Cytidine-Phosphate-Guanosine

CRT: calréticuline

CT: Computerized Tomography

CTD: C-Terminal Domain

CTLA-4: Cytotoxic T-Lmphocyte Antigen-4

CTCL: Cutaneous T-Cell Lymphoma –

DAMP: Damage-Associated Molecular Pattern

DARPin: Designed Ankyrin Repeat Protein

DC: Dendritic Cell

DC-SIGN: DC-Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grabbing Nonintegrin

DR: Death Receptor

EGF: Epidermal Growth Factor

EGFR: EGF Receptor

EIF2 α : Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 alpha

EpCam: Epithelial cell adhesion molecule

FDA: Food and Drug Administration

GFP: Green Fluorescent Protein

GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

HER2/neu: Human Epidermal Growth Factor Receptor-2

HMGB1: High-Mobility Group Box 1

HSP: Heat Shock Protein

HSV: Herpes Simplex Virus

IFIT1: Interferon-induced protein with Tetratricopeptide repeats 1

IFN: Interferon

IFNAR: IFN- α/β Receptor

iHDAC: inhibiteur d'histones déacétylases

IKKε: IκB kinase-ε

IL: Interleukine

IRF: IFN Regulatory Factor

ISG: Interferon-Stimulated Gene

ISGF3: ISG Factor 3

ISRE: IFN-stimulated response elements

JAK: Janus Associated Kinase

Jnk: c-Jun N-terminal kinase

LGP2: Laboratory of Genetics and Physiology
2

LPS: Lipopolysaccharide

LT: lymphocyte T

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

MAVS: Mitochondrial Anti-Viral Signaling

MC1R: Melanocortin-1 Receptor

Mcp : Membrane Cofactor Protein

Mda5: Melanoma differentiation-associated
protein 5

MDA: Microtubule-Destabilizing Agents

MeP: 6-methylpurine

MeP-dR: 6-methylpurine-2'-deoxyriboside

miR: microARN

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MITF: Microphthalmia-associated
Transcription Factor

MMP: Matrix Metalloproteinase

MOI: multiplicity of infection

MPM: Mésothéliome Pleural Malin

mTOR: Mammalian target of rapamycin

MV: Measles Virus

Mx: Myxomavirus resistance

MyD88: Myeloid Differentiation primary
response gene 88

NAP: Neutrophil-Activating Protein

NDV: Newcastle Disease Virus

NF-κB: Nuclear Factor kappa B

NIS: Na/I Symporter

NK: natural killer

NOD: Nucleotide-binding Oligomerization
Domain

OAS: Oligoadenylate Synthetase

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PAMP: Pathogen-Associated Molecular
Patterns

PD-1: Programmed cell Death 1

PD-L1: Programmed cell Death Ligand 1

Pexa-Vec: pexastimogene devacirepvec

PFU: Plaque Forming Units

PI3K: Phosphoinositol 3 kinase

PKR: Protein Kinase R

PNP: Purine Nucléoside Phosphorylase

Poly (I: C): polyinosinic-polycytidylic acid

PRR: Pattern Recognition Receptor

PSCA: prostate stem cell antigen

PSMA: Prostate-Specific Membrane Antigen

PVRL-4: PolioVirus Receptor-Like protein 4

RB: Retinoblastoma 1

RE: réticulum endoplasmique

RGP: radial growth phase

RIG-I: Retinoic acid-Inducible Gene-I

RLR: RIG-I Like Receptor

RNP: ribonucléoprotéine

RSAD2: Radical S-Adenosyl Methionine Domain Containing 2

SCD: super-cytosine deaminase

scFv: single-chain fragment variable

SCR: short consensus repeats

SLAM: Signaling Lymphocyte Activation Molecule

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

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

TBK1: TANK-binding kinase

TCID50: 50% Tissue Culture Infectious Dose

TEP : tomographie par émission de positons

TGF-β: Transforming Growth Factor-β

TK: Thymidine Kinase

TLR: Toll-like receptor

TNF-α: Tumor Necrosis Factor-alpha

T-Vec: talimogene laherparepvec

TYK: Tyrosine Kinase

UV: UltraViolet

VGP: Vertical Growth Phase

VSV: Vesicular Stomatitis Virus

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figures :

Figure 1. Développement du mélanome avec les différentes phases de progression.....	10
Figure 2. Voies moléculaires et gènes fréquemment mutés dans le mélanome.	11
Figure 3. Modèle proposé concernant le développement tumoral cellulaire et moléculaire du mélanome.....	13
Figure 4. Mécanismes d'action des virus oncolytiques.....	32
Figure 5. Dérivation des souches vaccinales du virus de la rougeole à partir de la souche Edmonston sauvage originale.	42
Figure 6. Représentation schématique de a) la structure d'une particule virale et b) de l'organisation du génome du virus de la rougeole.....	43
Figure 7. Récepteurs cellulaires identifiés pour le MV.	45
Figure 8. Les modifications génétiques de la souche MV-Edmonston.	50
Figure 9. Structure des RLR.	70
Figure 10. Activation de la réponse IFN type I sous les RLR et régulation cellulaire.	74
Figure 11. Réplication sélective des virus oncolytiques dans les cellules tumorales.....	77

Tableaux

Tableau 1. Propriétés des virus oncolytiques à ADN.	21
Tableau 2. Propriétés des virus oncolytiques à ARN.....	21
Tableau 3. Virus oncolytiques clés dans les essais cliniques.....	34
Tableau 4. Les modifications génétiques de la souche MV-Edmonston.	59
Tableau 5. Essais cliniques utilisant le virus de la rougeole.....	60

INTRODUCTION

PARTIE I : Le Mélanome

Le mélanome représente la forme la plus rare mais néanmoins la plus agressive des cancers cutanés. Lorsqu'il est métastatique, il est considéré comme un des cancers les plus résistants aux traitements conventionnels. Aujourd'hui, ce cancer apparaît comme celui pour lequel les avancées thérapeutiques récentes sont les plus significatives. Ce type de cancer particulièrement résistant aux traitements a servi de modèle d'étude à mes travaux de thèse pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques par la virothérapie antitumorale.

I. Généralités

Le mélanome est une tumeur maligne qui se développe à partir des mélanocytes, les cellules pigmentaires de l'organisme. Ces cellules sont présentes dans la couche basale de l'épiderme et sont spécialisées dans la synthèse de mélanine à l'origine de la pigmentation de la peau et dont le rôle principal est la protection de la peau contre les radiations ultraviolettes (UV). Les mélanomes sont dans la majorité des cas cutanés mais d'autres formes primitives plus rares de mélanomes muqueux et oculaires sont possibles. Environ 80% des mélanomes surviennent *de novo* en peau saine. Ils peuvent de plus résulter de la transformation maligne d'un nævus bénin préexistant [1], [2]. Bien qu'il ne représente que 5 à 10 % des cancers cutanés, le mélanome représente la forme la plus agressive puisqu'il est à l'origine de près de 80% des décès associés aux cancers cutanés. Ce cancer produit des métastases en abondance et résiste aux chimio-, radio- et immunothérapies disponibles. Traité à temps, ce cancer de la peau peut généralement être guéri, mais quand il est découvert à un stade avancé de la maladie, l'espérance de vie n'est en moyenne que de quelques mois, d'où l'importance du dépistage précoce.

A l'heure actuelle, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 132 000 cas de mélanomes cutanés sont enregistrés chaque année dans le monde, soit 15 à 20 fois moins que pour les autres cancers cutanés (2 à 3 millions de cas enregistrés par an). Le mélanome est le cancer qui est marqué par la plus forte augmentation d'incidence de l'ensemble des cancers évalués depuis ces trente dernières années [3]. L'incidence mondiale a en effet doublé en 15 ans et était estimée en 2011 à 10,5 cas pour 100 000 hommes et 9,7 cas pour 100 000 femmes.

En France, le mélanome se situait en 2011 au 9ème rang des cancers tous sexes confondus avec 9780 nouveaux cas estimés (dont 52 % survenant chez la femme) et représentait 2,7% des cancers incidents[4]. Il était au 16ème rang et représentait 1% de l'ensemble des décès par cancer.

II. Les facteurs de risques

Le mélanome malin est une maladie multifactorielle qui dépend principalement de l'interaction de facteurs environnementaux et de facteurs constitutifs. Les facteurs environnementaux sont liés à une exposition au soleil et aux UV artificiels[5]. Ainsi, le rayonnement UV représente le seul facteur de risque exogène de mélanome identifié.

Les principaux facteurs constitutifs de risque sont : un nombre de grains de beauté supérieur à 40, la présence d'un nombre de grains de beauté atypique aussi appelé nævus dysplasique supérieur ou égal à 2, la présence d'un nævus congénital à mélanocytes géant (l'association de ces deux derniers définissant le syndrome des nævus dysplasique) [6], les antécédents personnels ou familiaux de mélanome [7] et une immunodépression constitutionnelle ou acquise.

De plus, certaines personnes sont plus sensibles que d'autres aux rayons UV. Le risque de développer un mélanome est d'autant plus important que la coloration de la peau soit claire. Du fait de l'absence relative de pigmentation cutanée, ces personnes sont moins protégées contre les radiations ultraviolettes. Les sujets à peau claire ont 20 fois plus de risque de développer un mélanome que les sujets à peau foncée [8]. Ce risque est maximal pour les personnes de phototype I c'est-à-dire les personnes ayant une peau très claire avec des cheveux roux ou blonds.

L'âge et le genre sont aussi des facteurs de risque de développement d'un mélanome. Les femmes sont préférentiellement touchées lorsqu'elles sont jeunes, alors que les hommes ont 1,6 fois plus de risques d'être atteint de cette pathologie au cours de leur vie. Cependant, les deux facteurs principaux décrits à l'heure actuelle sont les expositions aux ultra-violets (UV) et les antécédents familiaux.

1. Expositions aux ultraviolets (UV)

Les études épidémiologiques accordent un rôle primordial à l'interaction entre le type de peau et l'exposition aux rayons ultraviolets (UV). Cette relation entre mélanome

cutané et dose d'exposition aux UV dépend de la période et de l'intensité des rayons UV. Le risque de développer un mélanome est influencé par les antécédents de coups de soleil sévères pendant l'enfance et les expositions intermittentes au soleil tout au cours de la vie [5]. Une exposition prolongée ou récurrentes aux UV qui sont hautement pathogènes augmente le risque de développer des altérations des gènes impliqués dans la prolifération et l'adhésion des mélanocytes. On estime que 65 à 95 % des mélanomes cutanés sont causés par l'exposition au soleil. L'Australie est le pays le plus touché par ce cancer avec une incidence supérieure à 30 cas pour 100 000 habitants [9]. Ceci semble être expliqué par le phototype majoritairement clair de ses habitants et la localisation géographique de ce pays se trouvant dans une zone à faibles latitudes où la protection de la couche d'ozone est diminuée. Par ailleurs, ce taux est également plus élevé près des côtes où la population s'expose plus au soleil du fait des loisirs balnéaires que dans les terres.

De plus, l'exposition aux UV artificiels via l'utilisation de cabines de bronzage a été démontrée comme un facteur de risque majeur pour le développement des mélanomes [10].

2. Antécédents familiaux

De nombreuses pathologies cancéreuses ont vu un lien de transmission entre les générations, comme le cancer du sein avec la mutation du gène BRCA1[11]. Ainsi, les facteurs génétiques interviennent de façon non négligeable à côté des rayons ultraviolets dans la survenue du mélanome. Dans 10% des cas, il existe une prédisposition génétique au développement du mélanome. Le mélanome familial est défini par la survenue d'au moins 2 mélanomes sur 3 générations. Il a été démontré dans ces familles à risque des mutations constitutionnelles du gène CDKN2 (cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2A), la mutation de ce gène étant associée à une dérégulation de la prolifération des mélanocytes [12].

D'autres mutations sont aussi considérés à haut risque comme le gène CDK4 (cyclin-Dependent Kinase), MITF (Microphthalmia-associated Transcription Factor), et RB (Retinoblastoma 1). Ces mutations sont associées à un risque accru de mélanome et peuvent faire l'objet d'une procédure de dépistage familial.

III. Description de la pathologie et développement tumoral

Le mélanome résulte de la transformation et de la prolifération non contrôlée des mélanocytes. On classe les mélanomes selon cinq catégories histologiques basées sur la

localisation et la croissance : le mélanome superficiel extensif (60-70 % des mélanomes), le mélanome nodulaire (15 à 30%), le lentigo malin (5-10 %), le mélanome acral lentigineux (2 à 10%) et le mélanome desmoplastique (1,7 à 4%).

1. La progression tumorale : des mélanocytes au mélanome

En matière de progression tumorale du mélanome, un modèle basé sur des observations cliniques et histopathologiques a été établi. Ce modèle est appelé « modèle de Clark » ; il décrit les différentes étapes de la transformation maligne d'un mélanocyte en mélanome[13]. Selon ce modèle, la première étape est une prolifération des mélanocytes normaux conduisant au développement d'un nævus bénin (**Figure 1**). Lors de la deuxième étape, une prolifération aberrante à partir soit d'un nævus préexistant, soit d'une nouvelle localisation, conduit au nævus dysplasique qui présente une atypie structurale. La phase de croissance horizontale ou RGP (Radial Growth Phase) représente l'extension intra-épidermique du mélanome, résultant de sa prolifération ; cette phase pourrait durer de 1 à 5 ans [14]. L'exérèse chirurgicale de cette tumeur prévient l'évolution de la maladie et permet une guérison complète de la tumeur sans risque de récurrence métastatique.

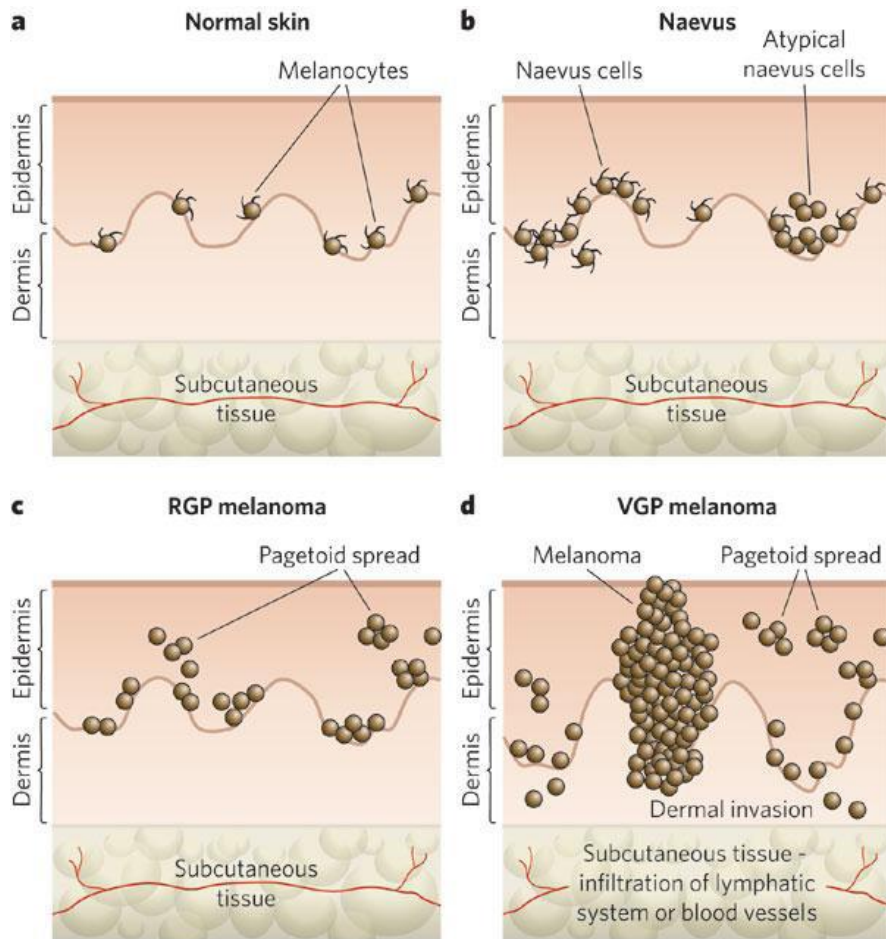


Figure 1. Développement du mélanome avec les différentes phases de progression.

a) Le développement d'un mélanome à partir de mélanocytes sains. b) La première phase correspond au développement d'un nævus, puis s'en suit c) une phase de croissance radiale et d) une phase de croissance verticale avec une invasion du derme avant la dissémination métastatique [15].

A un stade plus avancé, les cellules de mélanome deviennent plus agressives. Ces cellules deviennent capables de traverser la membrane basale, de quitter l'épiderme, de survivre dans le derme et de le coloniser pour former des nodules expansifs. Le mélanome s'étend par la suite verticalement et envahit les tissus sous-jacents ; ce stade de développement tumoral est appelé phase à croissance verticale ou VGP (Vertical Growth Phase). A cette étape, la tumeur acquiert un potentiel de dissémination métastatique, dès lors l'évaluation du pronostic de la maladie et du risque de récurrence se complexifie. Les cellules cancéreuses du mélanome vont disséminer depuis le derme dans l'organisme via les vaisseaux sanguins ou les vaisseaux lymphatiques et s'implanter à distance de la tumeur primaire. Ainsi, les patients développent des métastases à distance cutanées et viscérales affectant le plus souvent les poumons, le cerveau et le foie [16].

2. Les gènes impliqués dans le mélanome

L'identification des gènes suppresseurs de tumeurs et des oncogènes est à l'origine d'avancées majeures en cancérologie. Ainsi, plusieurs oncogènes cellulaires ont été identifiés, notamment BRAF, RAS et EGFR dans le mélanome. Ces derniers sont la cible de mutations somatiques impliquées dans le processus de transformation cellulaire. Ces mutations induisent une activation constitutive de voies moléculaires impliquées dans la prolifération, la différenciation, la motilité et la sénescence des mélanocytes. La transformation cancéreuse des cellules de mélanome résulte de l'activation conjointe de plusieurs oncogènes et/ou de la perte de gènes suppresseurs de tumeurs [17], [18], ce qui induit des changements complexes dans les différentes voies de signalisation (**Figure 2**). Ces voies sont principalement : la voie des MAP Kinases avec la cascade des protéines RAS/RAF/MEK/ERK, la voie PI3K/AKT, la voie p16 et p14 avec la cascade CDKN2A/p53, et la voie MITF [19].

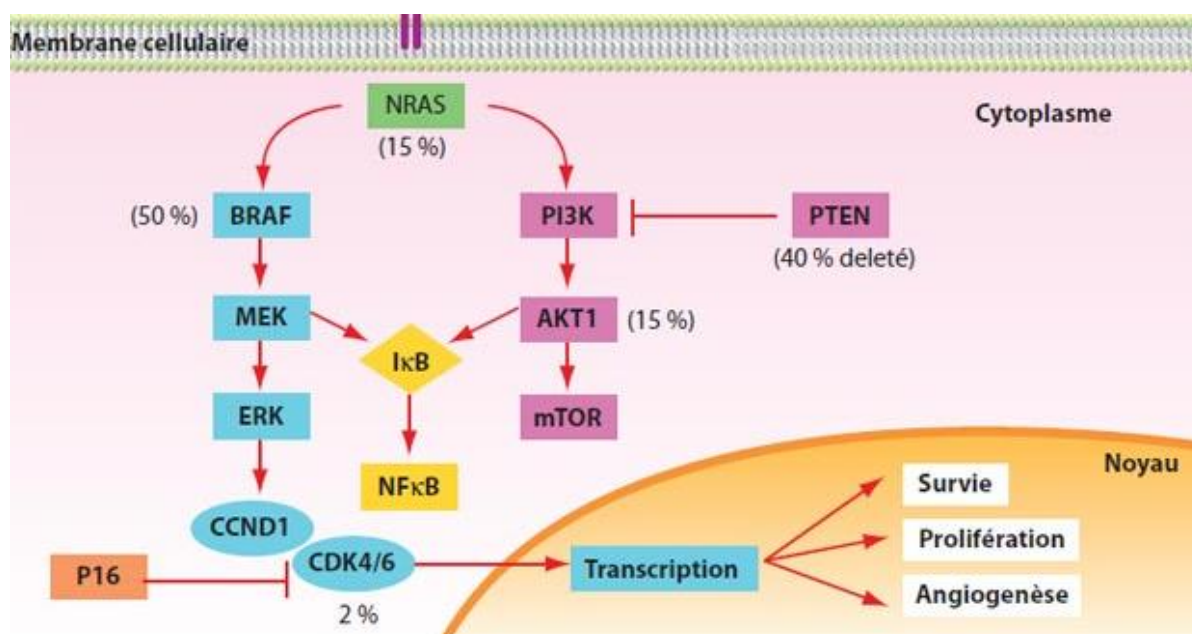


Figure 2. Voies moléculaires et gènes fréquemment mutés dans le mélanome.

La voie de signalisation des MAP-kinases (RAS-RAF-MEK-ERK) et la voie PI3K/Akt présentent la majorité des mutations, permettent la prolifération, la survie et la progression des mélanomes (adapté de Palmieri et al., 2009) [19].

Plusieurs gènes sont mutés dans ces voies et sont actuellement des cibles thérapeutiques visées par les thérapies ciblées de nouvelle génération (BRAF, MEK). La

voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) constituée de la cascade d'activation NRAS/BRAF/MEK /ERK constitue l'altération la plus fréquemment retrouvée dans les mélanomes (80% des cas) [20], [21] et représente la cible thérapeutique majeure. Cette voie est impliquée dans les mécanismes de croissance et de survie cellulaire. Plusieurs mécanismes peuvent conduire à cette activation. Le gène BRAF impliqué dans cette voie de signalisation, est fréquemment muté. La présence de BRAF muté est également détectée dans les nævus bénins et dysplasiques montrant qu'il s'agit d'un événement précoce dans la progression du mélanome (**Figure 3**) [22]. En effet, 50% des mélanomes portent une mutation du gène BRAF qui est dans 90% des mutations du codon 600 de BRAF [23], [24]. La découverte de ces mutations activatrices de l'oncogène BRAF a conduit au développement d'une stratégie de thérapie ciblée inhibant BRAF. Ainsi, des essais cliniques ont démontré que l'utilisation d'inhibiteurs de la forme muté BRAF V600E a conduit à une augmentation de survie globale des patients atteints de mélanome métastatique [25]. D'autres altérations génétiques sont aussi responsable de la transformation des mélanocytes telles que l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs comme CDKN2A et p53 [26] ou l'activation d'autres voies de signalisation comme la voie PI3K/AKT, impliquée dans la régulation de l'apoptose.

Enfin, l'acquisition d'un phénotype invasif lors de la dissémination des cellules tumorales est due à des modifications de l'expression de plusieurs protéines d'adhésions (cadhérines, intégrines). Ces modifications permettent à une cellule épithéliale d'acquérir l'ensemble des capacités lui permettant de survivre, proliférer et migrer dans un environnement mésenchymateux [27], [28].

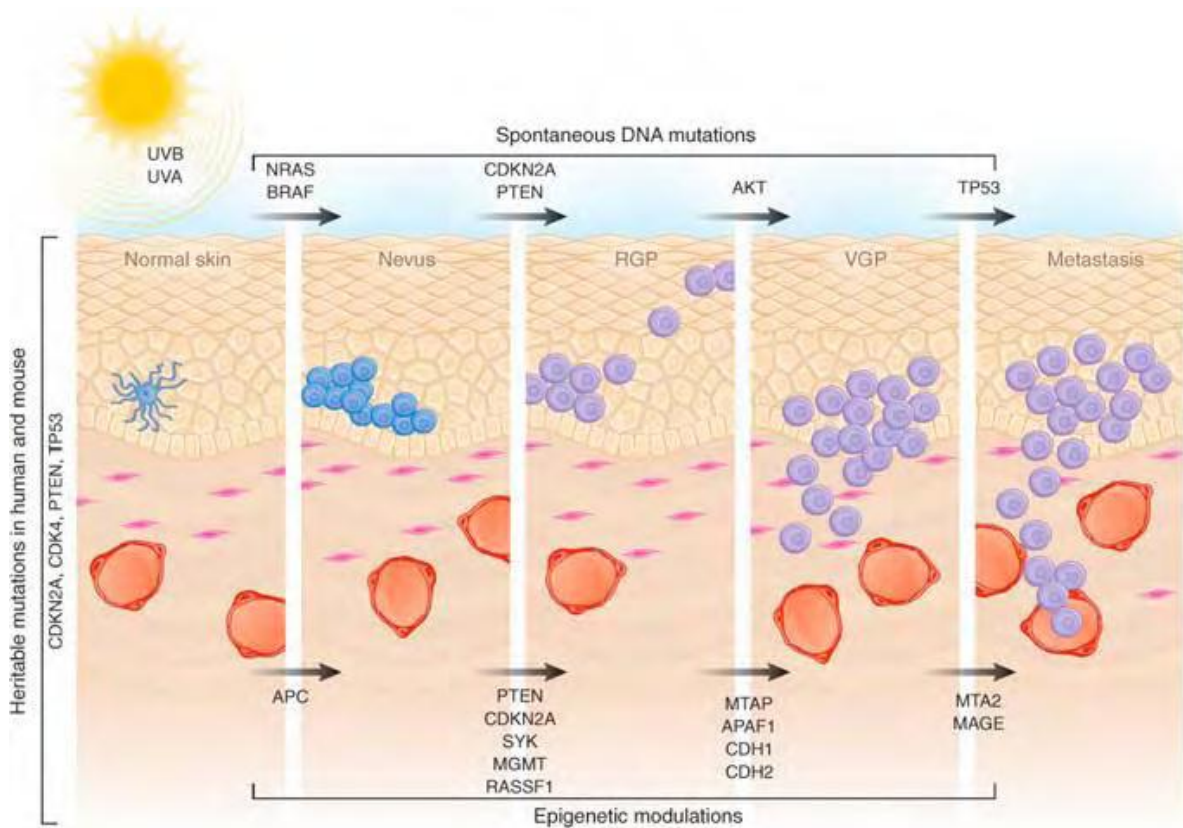


Figure 3. Modèle proposé concernant le développement tumoral cellulaire et moléculaire du mélanome.

La prolifération aberrante des mélanocytes suite à l'exposition aux rayonnements UV aboutit à la formation d'un nævus dysmorphique. La phase de croissance radiale (RGP) correspond à une prolifération cellulaire intradermique suivie de la phase de croissance verticale (VGP) et l'invasion du derme aboutissant à la phase métastatique. Des mutations spontanées de l'ADN ont été observées dans plusieurs gènes (BRAF, NRAS, PTEN, AKT, P53) et pourraient participer aux différents stades de progression du mélanome [28].

IV. Les traitements actuels

Dans la grande majorité des cas de mélanomes diagnostiqués, il s'agit de tumeurs primaires sans signe évident de la présence de métastases (stade I). Ces tumeurs sont systématiquement traitées par exérèse chirurgicale. La survie des patients atteints de ce type de tumeur est de 75 à 85% [29]. Les traitements systémiques sont utilisés lorsque les patients présentent des signes de dissémination métastatique. Dans ce cas la survie n'excède pas les 10%. Les traitements proposés sont principalement des immunothérapies pour les stades II et III et des chimiothérapies pour les stades IV. Cependant, ces traitements ne permettent pas d'améliorer la survie des patients avec moins de 20% de réponses objectives pour l'ensemble des traitements disponibles [30]. Récemment, de nouvelles approches thérapeutiques ont été

développées, permettant une meilleure prise en charge des patients atteints de mélanome métastatiques.

1. La chirurgie

L'exérèse chirurgicale de la tumeur primitive est le seul traitement curatif pour le mélanome. Dans les stades I à III, une ablation de la tumeur primaire est effectuée associée à l'ablation de la chaîne ganglionnaire en cas d'adénopathies pathologiques détectées par l'examen clinique. En cas de métastases à distance, le retrait chirurgical de la tumeur primaire ainsi que des métastases si celles-ci sont accessibles est réalisé en première intention. Un traitement complémentaire par radiothérapie ou chimiothérapie peut être envisagé.

2. L'immunothérapie

Le système immunitaire est très important dans la progression tumorale du mélanome. Les traitements reposant sur l'immunothérapie se sont largement développés et ont pour objectif de favoriser la destruction de la tumeur par les cellules du système immunitaire et de rompre la tolérance immunitaire vis-à-vis du mélanome. Nombreuses sont les stratégies actuellement évaluées pour le traitement du mélanome. Ici, je vais discuter uniquement des thérapies utilisées et validées à ce jour.

Le traitement par interféron-alpha peut être proposé en traitement adjuvant à partir des stades II. Cette approche débute rapidement après la chirurgie et dure entre 1 an et 18 mois. Cette cytokine est produite par le système immunitaire en réponse à des pathogènes tels que les virus ou les bactéries. La sécrétion d'interféron stimule les cellules de l'immunité telles que les lymphocytes T, les NK et les macrophages afin d'augmenter la reconnaissance et l'éradication des pathogènes et également des cellules tumorales. Ainsi l'utilisation de cette cytokine permet de stimuler la reconnaissance des tumeurs par le système immunitaire. Ce traitement montre une efficacité variable selon la dose et le stade de la maladie avec un rapport bénéfice/risque réduit [31].

Un deuxième immunostimulant utilisé comme immunothérapie est l'interleukine 2. Cette cytokine a été approuvée premièrement par la FDA pour le traitement du mélanome. Elle est décrite pour son rôle dans l'homéostasie des LT et des NK. De hautes doses d'interleukine-2 (IL-2) sont préconisées en cas de mélanome métastasé (stade IV). Cependant, ce traitement reste peu efficace avec seulement 7% de rémissions complètes.

Néanmoins, aucun bénéfice sur la survie avec ce traitement n'est aujourd'hui admis, avec notamment de nombreux problèmes de tolérance [32] [33].

3. La chimiothérapie

La chimiothérapie fut jusqu'à ces dernières années le traitement de référence du mélanome métastatique. Les médicaments utilisés en première ligne thérapeutique sont principalement des agents alkylants tels que la dacarbazine (Déticène®), malgré des taux de réponses objectives limités. D'autres dérivés alkylants, la fotemustine (Muphoran®) et le témozolomide (Temodal®), ont été développés pour le traitement en particulier des métastases cérébrales. Globalement, le traitement par chimiothérapie est actuellement de moins en moins utilisé du fait d'une efficacité très modeste, et progressivement remplacé par les nouvelles thérapies spécifiques.

4. La radiothérapie

La radiothérapie est généralement peu utilisée dans le traitement du mélanome métastatique. Peu d'études sérieuses ont été menées sur son efficacité. Une forte radiorésistance a été très rapidement observée, limitant son utilisation dans le cadre des thérapies pour le mélanome. En effet, la nature radiorésistante des cellules de mélanome peut s'expliquer par les mécanismes altérés lors des expositions aux rayonnements UV, favorisant la survie [33]. Elle est généralement prescrite à visée palliative pour les métastases osseuses symptomatiques ou cérébrales non opérables [34].

5. Nouvelles modalités thérapeutiques

Ces dernières années, de nouveaux traitements sont apparus pour la prise en charge des formes métastatiques avec un bénéfice significatif sur la survie des patients. Ces traitements sont soit des thérapies ciblées, soit de l'immunothérapie. En particulier, plusieurs molécules sont actuellement disponibles à la commercialisation avec une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) pour le traitement des formes non-résécables et/ou métastatiques de mélanome. Il s'agit des inhibiteurs de la forme mutée de BRAF : vemurafenib (Zelboraf®) et dabrafenib (Tafinlar®), et des anticorps anti-CTLA-4 (Yervoy®). Ces traitements ont amélioré la médiane de survie sans progression dans le traitement du mélanome métastatique dans des études de phase III distinctes et ont apporté de nouvelles perspectives dans la prise en charge des patients atteints de mélanome [25], [35], [36].

a) Les inhibiteurs de BRAF

La compréhension des mécanismes génétiques impliqués dans le développement du mélanome a permis l'émergence des thérapies ciblées visant à inhiber les voies spécifiquement dérégulées. Le Vémurafenib (Zelboraf®) est un inhibiteur de la forme mutée B-Raf V600E développé en 2010. Ce traitement représente une avancée majeure dans la prise en charge des patients ayant un mélanome métastatique présentant cette mutation. Le taux de réponse objective à ce traitement est proche 50% contre 5% pour la dacarbazine. La survie après 6 mois de traitement est de 84% pour les patients recevant le vémurafenib contre 64% pour la dacarbazine [25]. Toutefois, ce traitement ne conduit à des réponses complètes que dans 4 à 9% des cas. De plus, l'indication des inhibiteurs de BRAF sont exclusivement utilisés dans le traitement des patients ayant cette mutation, laissant 50% des patients inéligibles à ces traitements.

Ces résultats encourageants ont poussé au développement d'autres inhibiteurs des voies impliquées dans le mélanome. Ainsi la protéine MEK a été évaluée comme une cible thérapeutique additionnelle. En 2013, la FDA a validé le premier inhibiteur de MEK, le tramétinib (Mekinist®), qui est utilisé en monothérapie chez des patients mutés BRAF. Le traitement a montré une médiane de survie globale de 15,6 mois. Toutefois ces traitements sont restreints aux patients éligibles et ne conduisent pas à ce jour à des réponses durables et complètes.

b) Le blocage des points de contrôle

Le développement des anticorps visant à bloquer les voies de contrôle inhibitrices des LT et à rétablir leur activité anti-tumorale optimale, a constitué une avancée majeure dans le traitement du mélanome métastatique. En effet, l'activation des LT est modulée positivement par des signaux de co-stimulation, garantissant l'activation optimale des LT ou négativement par des signaux de co-inhibition, permettant de maintenir la tolérance au soi et de prévenir une auto-réactivité. Dans le contexte tumoral, ce dernier mécanisme de tolérance est largement exploité par les cellules tumorales.

La molécule CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4), exprimée à la surface des lymphocytes T, interagit avec les molécules B7, B7.1 (CD80) et B7.2(CD86) à la surface des cellules dendritiques. Le signal passant par la molécule CTLA-4 est inhibiteur et régule négativement l'activation lymphocytaire T. L'ipilimumab est un anticorps monoclonal anti

CTLA-4, inhibant ce processus de rétrocontrôle et favorisant l'activation des populations lymphocytaires à spécificité anti-tumorale.

Le succès des anticorps anti CTLA-4 a encouragé le développement d'anticorps ciblant d'autres points de contrôle tels que les anticorps anti-PD-1 (programmed death 1). En effet, la molécule PD-1 est une autre molécule de rétrocontrôle négatif, exprimée à la surface des lymphocytes T et des cellules tumorales dont celles de mélanome. Ces récepteurs modulent une voie qui conduit à inhiber l'activation des lymphocytes T, cette même voie est utilisée par les cellules tumorales leur permettant d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. PD-1 fonctionne principalement dans les tissus périphériques, où les cellules T peuvent interagir avec les ligands PD-L1 et PD-L2. Ainsi, l'interaction entre PD-1 et PD-L1 conduit à l'inhibition des lymphocytes T. En bloquant cette interaction, les anticorps anti-PD-1 lèvent ce frein en induisant une activité anti-tumorale. Le nivolumab (Opdivo®) et le Pembrolizumab (Keytruda®), deux anticorps monoclonaux ciblant le PD-1 sont autorisés par la FDA pour le traitement du mélanome métastatique. Les traitements antiPD-1, après des résultats prometteurs en essais de phase I/II, ont montré une réponse plus importante et plus rapide que l'ipilimumab, avec un taux de réponse objective de 30 à 50%. De plus, ces anticorps présentent l'avantage d'avoir une moindre toxicité et des effets secondaires moins pénibles et moins graves qu'avec l'ipilimumab, permettant le plus souvent une vie normale [37].

Enfin, des associations des molécules d'immunothérapie entre elles ou entre immunothérapie et thérapie ciblée semblent prometteuses et sont étudiées actuellement dans différents essais cliniques. Ainsi, l'identification de nouvelles cibles moléculaires et le développement de nouveaux essais cliniques doivent donc se poursuivre afin d'évaluer la combinaison qui permettra de faire progresser le traitement du mélanome métastatique.

c) Les virus oncolytiques

Le talimogène laherparepvec, plus simplement appelé « T-VEC » est un virus oncolytique recombinant, obtenu à partir du virus herpès simplex 1, qui a reçu l'autorisation de la FDA pour le traitement du mélanome métastatique. Il s'agit d'un virus herpès délété de sa partie active, impliquée dans la pathogénicité, la réplication virale et la présentation antigénique. Ces délétions restreignent la réplication du virus aux cellules tumorales. Il a été également introduit dans ce virus, le gène du facteur de croissance des macrophages (GM-CSF). Ce vaccin, injecté dans la tumeur, cumule deux effets : 1/ un effet oncolytique direct

exercé par le virus suite à sa réplication sélective dans les cellules tumorales et 2/ un effet indirect par la stimulation de l'immunité antitumorale par le GM-CSF. Ce traitement s'adresse aux patients qui ont des métastases cutanées, sous-cutanées ou ganglionnaires non résecables [38]. Dans le cadre des essais cliniques, l'effet du T-VEC est particulièrement important chez les patients dont le mélanome est en stade avancé et n'ont jamais connu d'autres traitements. Ce traitement génère un taux de réponse objective globale de 26% et une amélioration de la médiane de survie globale à 23,3 mois. L'efficacité de ce traitement est surtout importante dans la durée avec 16,3% de réponses complètes ou partielles d'une durée supérieure à 6 mois.

Ces résultats encourageants ont conduit au développement de nouvelles stratégies de combinaison telles que l'association du T-Vec avec l'ipilumimab ou le pembrolizumab, qui sont actuellement en phase d'évaluation. Ces combinaisons semblent être efficaces et tolérées avec un taux de réponse globale objective de 56% [39].

Conclusion

Le mélanome est un cancer cutané dont l'incidence augmente depuis des années, ce qui en fait un véritable problème de santé publique. C'est une pathologie qui touche tous les âges même si elle est rare chez l'enfant. Il est important de la diagnostiquer tôt car la majorité des formes localisées guérissent. Une fois la maladie devenue métastatique, le pronostic reste très sombre. L'avènement de nouvelles approches thérapeutiques pour les formes métastatiques, avec la mise sur le marché d'immunothérapies et d'inhibiteurs de protéines kinases, a permis de modifier sensiblement la prise en charge des patients. Cependant, malgré ces avancées, il y a encore des patients réfractaires aux thérapies immunitaires et ciblées. Il y a donc un besoin de traitements complémentaires. Dans cette optique, la virothérapie anti-tumorale semble être un moyen thérapeutique très prometteur et l'étude de cette stratégie a fait l'objet de mes travaux de thèse.

PARTIE II : La virothérapie antitumorale

I. Principe

L'idée que les virus puissent agir comme agents thérapeutiques contre le cancer n'est pas nouvelle et date essentiellement du début du vingtième siècle. A cette époque, des observations cliniques de régressions tumorales coïncidant avec des infections virales naturelles ont été rapportées. Les premières observations ont été décrites comme celle d'une rémission temporaire d'une patiente atteinte de leucémie suite à une infection respiratoire, présumée être une grippe [40]. Plusieurs observations similaires décrivant la régression spontanée de diverses tumeurs chez des patients après un épisode d'infection virale ou une vaccination contre la rage par exemple, sont mentionnées [41]. Suite à ces observations, dans les années 1950, les premiers essais thérapeutiques chez l'homme ont commencé. Cependant, une compréhension limitée des virus et de leur mode de multiplication, ainsi que la présence d'effets secondaires, ne permit toutefois pas à cette approche d'être retenue [42]. L'intérêt pour cette stratégie thérapeutique, quasiment abandonnée pendant de nombreuses années, a connu un nouvel essor en raison des progrès réalisés dans le domaine de la biologie moléculaire.

Les virus oncolytiques sont caractérisés par leur capacité à infecter et à se répliquer préférentiellement dans les cellules tumorales, conduisant à leur lyse tout en laissant les cellules normales non transformées relativement indemnes [43]. En effet, il a été établi que les cellules cancéreuses, étant devenues déficientes dans les mécanismes de protection, de réparation cellulaire et d'apoptose, pouvaient devenir des cibles pour certains virus [44]. Ces virus exploitent, en effet, des aberrations cellulaires apparaissant lors de la transformation tumorale. Ces aberrations affectent par exemple la surexpression de molécules de surface utilisées comme récepteurs d'entrée des virus, ou les mécanismes de la réponse cellulaire antivirale. Ainsi, la voie de l'interféron de type I est un mécanisme clé de l'immunité innée dans le contrôle de la réplication virale. Cependant, dans de nombreuses tumeurs, on observe des mutations de la voie des interférons, ces mécanismes de défense demeurant au contraire fonctionnels dans les cellules normales. Ainsi, la cellule cancéreuse pourrait constituer un lieu préférentiel pour la réplication virale [45].

Les différents traitements contre le cancer ne sont pas toujours efficaces et provoquent de nombreux effets secondaires causés, entre autres, par la destruction de tissus sains. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles stratégies anti-tumorales plus spécifiques et qui pourraient s'attaquer aux métastases. Étant donné que le cancer est principalement lié à des instabilités génétiques dues aux dérèglements des gènes contrôlant le cycle cellulaire, la virothérapie anti-tumorale pourrait être une approche thérapeutique alternative à considérer. En effet, la spécificité tumorale induisant la mort des cellules tumorales ainsi que la capacité d'engager une réponse immunitaire contre les antigènes tumoraux sont les avantages qui font des virus oncolytiques une arme thérapeutique potentielle contre le cancer.

II. Types de virus oncolytiques

Les virus oncolytiques représentent un groupe hétérogène de virus possédant des propriétés intrinsèques diverses qui en font des outils intéressants pour l'utilisation en tant qu'agents anticancéreux. L'efficacité et la sécurité sont des éléments importants à prendre en compte pour un virus oncolytique destiné à être utilisé en thérapie. Un virus oncolytique idéal présente ainsi plusieurs caractéristiques : la capacité à infecter, se répliquer et détruire les cellules tumorales humaines tout en épargnant les cellules normales; la capacité à infecter un large panel de cellules tumorales ; le virus parental sauvage ne doit pas causer de pathologie sévère de par son activité intrinsèque au niveau des tissus sains et se doit d'être bien caractérisé. Un autre aspect concernant la sécurité d'utilisation d'un virus est sa non intégration dans le génome de la cellule hôte. Un virus à usage thérapeutique doit aussi être modifiable génétiquement, avec la capacité d'incorporer dans son génome une quantité suffisante d'information, et être très stable au niveau génomique. Ces critères sont très importants afin d'améliorer l'activité du virus par l'ajout de gènes stimulateurs ou suicides, ou pour permettre une répllication et un ciblage spécifique du virus dans la tumeur. Finalement, le virus doit être facile à produire avec des titres de production assez importants. Jusqu'à présent, une vingtaine de virus sont évalués dans des études précliniques pour leur potentiel oncolytique et la moitié a été évaluée dans des essais cliniques [46]. Les virus à ADN tels que les adénovirus, les herpès virus et le virus de la vaccine sont le plus souvent modifiés, en revanche les virus à ARN sont très souvent capables de cibler naturellement les cellules tumorales. On peut notamment citer le réovirus, le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) et le virus de la maladie de Newcastle (**Tableaux 1 et 2**).

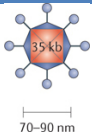

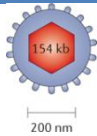

	Adénovirus	Virus de la vaccine	Herpès virus	Parvovirus H1
				
Classification de Baltimore	Groupe I: ADNds	Groupe I: ADNds	Groupe I: ADNds	Groupe II: ADNss
Famille	Adenoviridae	Poxviridae	Herpesviridae	Parvoviridae
Virion	Nu	Complexe	Enveloppé	Nu
Symétrie de la capside	Icosaédrale	Complexe	Icosaédrale	Icosaédrale
Site de Réplication	Noyau et cytoplasme	Cytoplasme	Noyau et cytoplasme	Noyau et cytoplasme
Récepteur cellulaire	CAR	inconnu	HVEM, nectin 1, nectin 2	résidus d'acide sialique

Tableau 1. Propriétés des virus oncolytiques à ADN.

(Adapté depuis Kaufman et al., 2015 [47]).


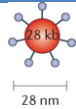


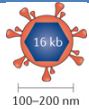
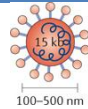
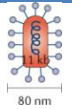
	Réovirus	Virus de coxsackie	Virus de la vallée des Sénécas	Poliovirus	Virus de la rougeole	Virus de la maladie de Newcastle	Virus de la stomatite vésiculaire
							
Classification de Baltimore	Groupe III : ARN ds	Groupe IV : ARN	Groupe IV : ARN ss(+)	Groupe IV : ARN ss(+)	Groupe V : ARN ss(-)	Groupe V : ARN ss(-)	Groupe V : ARN ss(-)
Famille	Reoviridae	Picornaviridae	Picornaviridae	Picornaviridae	Paramyxoviridae	Paramyxoviridae	Rhabdoviridae
Virion	Nu	Nu	Nu	Nu	Enveloppé	Enveloppé	Enveloppé
Symétrie	Icosaédrale	Icosaédrale	Icosaédrale	Icosaédrale	Icosaédrale	Hélicoïdale	Hélicoïdale
Site de Réplication	Cytoplasme	Cytoplasme	Cytoplasme	Cytoplasme	Cytoplasme	Cytoplasme	Cytoplasme
Récepteur cellulaire	inconnu	CAR/ICAM-1/DAF	inconnu	CD155	SLAM et CD46	inconnu	LDLR

Tableau 2. Propriétés des virus oncolytiques à ARN.

(Adapté depuis Kaufman et al., 2015 [47]).

Dans cette partie, je discuterai brièvement de quelques virus oncolytiques parmi les plus étudiés et de leurs modifications génétiques.

1. Les herpès virus

Les herpès simplex virus (HSV) sont des virus de 100 à 200 nm de diamètre, enveloppés, à ADN double brin linéaire présentant une forte efficacité d'infection,

notamment vis-à-vis des cellules neurales et épithéliales. Il existe deux types HSV humains, le type 1 (HSV-1) et le type 2 (HSV-2) qui sont tous deux pathogènes pour l'Homme. Le HSV-2 est associé aux maladies sexuellement transmissibles, tandis que le HSV-1 entraîne généralement des infections de la peau. Les HSV possèdent deux propriétés biologiques uniques qui peuvent influencer la maladie chez l'Homme : la neurovirulence et la latence. Malgré son tropisme pour le système nerveux, le HSV-1 possède un grand nombre de caractéristiques mentionnées précédemment pour un virus oncolytique idéal, y compris un grand génome permettant la suppression ou le remplacement jusqu'à 30 kb, aucune étape d'intégration génomique même si sa réplication a lieu dans le noyau et la disponibilité d'un certain nombre de médicaments anti-herpétiques [48]. Ainsi, différents groupes de recherche développent des vecteurs HSV dirigés contre les cellules cancéreuses. Un des exemples les plus récents porte sur l'utilisation d'un vecteur HSV-1 délété du facteur de virulence ICP34.5, ce qui diminue de façon importante sa réplication dans le système nerveux central et les formes latentes tout en conservant la réplication virale dans les cellules en division comme les cellules tumorales. La base de cette sélectivité tumorale est liée à la voie de défense antivirale cellulaire de la protéine PKR (Protein Kinase R). En effet, le facteur ICP34.5 bloque normalement la protéine PKR qui inhibe la réplication virale après détection du virus et la délétion de ce facteur confère au virus un tropisme pour les cellules tumorales dans lesquelles la protéine PKR est souvent inactive[49].

Un second facteur de virulence qui peut également être supprimé dans le HSV-1 est la thymidine kinase (TK) virale. Cette enzyme est essentielle à la transcription du génome viral mais est aussi présente dans les cellules en cours de réplication. Si le gène codant pour la TK virale est supprimé, l'apport de TK ne dépend que de la cellule et est donc fortement corrélé à l'état mitotique de celle-ci. Le virus se réplique ainsi de façon préférentielle dans les cellules en prolifération.

Un dernier exemple de modification du virus HSV1 est la délétion du gène inhibiteur de la présentation d'antigènes ICP47. Cette délétion permet d'augmenter l'efficacité répllicative en plus de minimiser la régulation à la baisse des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) à la surface des cellules infectées et donc d'améliorer l'immunogénicité du virus [50]. Comme la plupart des souches HSV-1 portant une seule mutation conservent souvent une toxicité résiduelle dans les cellules normales, des

souches portant plusieurs modifications ont été créées pour augmenter la sécurité sans compromettre son potentiel oncolytique [51].

Récemment, le virus Herpès Simplex recombinant pour le GM-CSF (HSV-1-hGM-CSF) développé par l'industriel Amgen et aussi appelé Talimogene Laherparepvec (TVEC) a été approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement du mélanome métastatique [38].

2. Les adénovirus

Les adénovirus (ADV) sont des virus à ADN double brin linéaire non enveloppés, la majorité étant impliqués dans des affections respiratoires ou digestives bénignes, même s'ils peuvent toutefois provoquer des complications chez des patients immunodéprimés [52]. Grâce à leur cycle lytique, ils sont capables de se répliquer spécifiquement dans les cellules tumorales et de les lyser tout en épargnant les cellules saines. Cette sélectivité pour les cellules tumorales résulte de modifications génétiques apportées au génome de ces ADV. En effet, les ADV offrent plusieurs possibilités de modification, notamment en insérant des séquences supplémentaires dans leur génome, ce qui explique en grande partie leur large utilisation en thérapie génique et en virothérapie. Les souches oncolytiques des ADV sont dérivées des ADV de type 5.

Plusieurs groupes ont développé de nouveaux ADV modifiés, capables de cibler plus spécifiquement les cellules tumorales. Une étude sur des cellules humaines de gliome *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de xéno greffe chez la souris, démontre l'efficacité d'un ADV modifié qui cible spécifiquement une forme mutée de l'EGF-R, Delta-EGF-R, exprimée uniquement sur certaines cellules tumorales [53]. De plus, l'insertion d'un promoteur tumoral spécifique dans le génome des ADV peut aussi permettre son ciblage contre les cellules tumorales [54]. Par exemple, le promoteur de la survivine a été inséré dans les vecteurs adénoviraux afin de contrôler l'expression du gène viral précoce E1A. La survivine est exprimée dans de nombreux cancers et joue un rôle central dans l'inhibition de l'apoptose. Une étude a ainsi montré qu'un ADV-survivine était effectivement capable de lyser spécifiquement plusieurs types de cellules tumorales *in vitro* et d'induire la régression d'ostéosarcomes humains dans un modèle murin [55].

L'adénovirus oncolytique le plus connu à ce jour est Onyx-015. Ce virus présente une délétion au niveau du gène E1B. Cette modification va aboutir à l'absence de production de la protéine virale E1B-55K qui ne pourra plus se lier à la protéine p53 pour neutraliser son action[56]. Par conséquent, dans les cellules saines, p53 est fonctionnelle et va bloquer l'entrée des cellules en phase S. La réplication virale ne pourra donc pas s'effectuer. Au contraire, dans les cellules tumorales présentant une protéine p53 mutée ou un défaut de signalisation de la voie p53, le cycle se trouve dérégulé, favorisant le passage en phase S des cellules. Ceci va permettre la réplication virale et la destruction des cellules tumorales[57], [58]. Ce virus a été évalué dans plusieurs essais cliniques sur le cancer. Cependant, le développement clinique a été interrompu en 2003 à cause de réponses thérapeutiques limitées[59].

En revanche, des progrès significatifs ont débouché sur l'acceptation en Chine du premier virus oncolytique approuvé en clinique, le H101, quasiment identique à ONYX-015. Ce virus possède une délétion du gène E3, qui code pour des protéines aux fonctions immuno-régulatrices [60]. Il est préconisé pour le traitement des cancers nasopharyngés réfractaires, en combinaison avec une chimiothérapie.

3. Le virus de la vaccine

Le virus de la vaccine (VV) appartient à la famille des poxvirus. Leur génome contient une seule molécule d'ADN bicaténaire linéaire. Ce virus a largement été utilisé dans l'histoire médicale humaine dans la lutte contre la variole et a permis son éradication. Le virus de la vaccine se réplique plus efficacement dans les cellules humaines présentant une activation constitutive de la voie EGF-R/Ras [61]. Ce virus présente l'avantage de pouvoir accueillir des séquences codantes importantes, ce qui permet d'améliorer son efficacité anti-tumorale. De plus, la délétion de certains gènes viraux nécessaires à l'infection des cellules saines, mais inutiles dans les cellules tumorales transformées, permet d'accroître le ciblage spécifique des cellules tumorales par ce virus.

Un virus de la vaccine, le JX-594, codant pour le GM-CSF, a démontré un fort potentiel oncolytique contre des tumeurs solides telles que le cancer du foie [62], ainsi que contre des métastases suite à une administration intraveineuse dans des modèles de rats et de lapins [63]. Plus récemment, ce même virus a été utilisé en étude clinique de phase II dans des cas de carcinomes hépatocellulaires. Il a été ainsi observé la régression de tumeurs non

injectées, démontrant encore l'efficacité de cette approche. Le GM-CSF aurait notamment permis de recruter des cellules NK et des cellules dendritiques dans l'environnement tumoral, permettant ainsi la sécrétion de différentes cytokines et l'activation d'une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique [64].

4. Les réovirus

Les réovirus sont des virus à ARN double brin non enveloppés, faiblement pathogènes chez l'Homme. La sélectivité de ce virus pour les cellules tumorales est due au fait que leur réplication dans les cellules normales est naturellement inhibée par la Protéine Kinase dépendante de l'ARN bicaténaire (PKR). Cependant, dans les cellules tumorales ayant une protéine Ras constitutivement activée menant à l'inactivation de PKR, les réovirus peuvent se répliquer librement. Comme aucune modification de la souche sauvage n'a été nécessaire, les réovirus sont considérés comme des virus oncolytiques naturels. Cet oncotropisme naturel a conduit à de nombreux essais cliniques contre une multitude de types de cancers, y compris le cancer colorectal, les gliomes, le cancer de l'ovaire et le mélanome[47].

En outre, les réovirus sont utilisés en combinaison avec d'autres types de traitements anti-tumoraux, comme la chimiothérapie. Une étude a démontré que la souche « Reovirus type 3 Dearing », agissait en synergie avec le cisplatine contre des mélanomes murins et humains [65].

5. Le virus de la maladie de Newcastle (NDV)

Le Virus de la Maladie de Newcastle est un virus enveloppé à ARN simple brin de la famille des paramyxovirus. C'est l'agent d'une maladie aviaire majeure et il est aussi responsable d'une zoonose mineure rare, non pathogène pour l'Homme. De même que pour les réovirus, la sélectivité du NDV pour les cellules tumorales dépend de l'activation constitutive de la voie Ras, mais aussi de l'inactivation des voies des IFN de type I.

Différentes souches atténuées du NDV présentant des propriétés oncolytiques naturelles ont été utilisées dans le cadre d'essais cliniques. La souche atténuée PV701 a ainsi été testée en phase I/II sur différents cancers solides [66]. Tous les résultats des expériences précliniques et des essais cliniques montrent que le NDV est un virus oncolytique extrêmement bien toléré et sûr.

6. Le virus de la stomatite vésiculaire (VSV)

Le Virus de la Stomatite Vésiculaire (VSV) est un virus enveloppé à ARN. Ce virus peut infecter tous les mammifères. Son large tropisme en fait donc un virus pouvant être largement utilisé pour son potentiel oncolytique contre différents types de tumeurs[67] et pouvant facilement être utilisé en modèle animal. Il a été démontré que le VSV est très sensible à l'inhibition de la synthèse des ARNm par les IFN. Ceci favorise sa réplication dans les cellules tumorales ayant un défaut de la réponse IFN, ce qui est retrouvé dans environ 80% des tumeurs humaines [68], [69].

III. Mécanismes d'action des virus oncolytiques

Les études réalisées ces vingt dernières années démontrent que les virus oncolytiques ont deux mécanismes d'action différents : 1) la réplication sélective dans les cellules tumorales, induisant la lyse directe et 2) l'induction d'une immunité anti-tumorale systémique qui contribue, en retour, à l'élimination des cellules tumorales, même non infectées[70]. Cette dernière voie semble très importante, voire prioritaire dans l'efficacité de la virothérapie antitumorale [71]. Ainsi, la contribution relative de ces mécanismes peut varier en fonction du type de la cellule cancéreuse, des caractéristiques du vecteur viral, et de l'interaction entre le virus, le microenvironnement tumoral et le système immunitaire de l'hôte.

1. Oncolyse naturelle

Certains virus sont capables de se répliquer préférentiellement dans les cellules tumorales, conduisant à leur lyse. Leur réplication et leur multiplication permettent l'infection des cellules adjacentes ainsi qu'une augmentation continue de la charge virale, jusqu'à l'intervention d'une réponse immunitaire ou la pénurie de cellules sensibles proches. Leur tropisme particulier est dû à la biologie de la tumeur.

Les cellules tumorales se développent en acquérant ou en perdant certaines fonctions afin d'échapper au contrôle normal de division tels que l'autosuffisance pour les signaux de croissance, la perte de la sensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance, l'échappement à l'apoptose, le potentiel de réplication illimité et la capacité d'invasion des tissus et métastases [72]. Ces changements contribuent largement à la réplication sélective des virus oncolytiques qui exploitent la machinerie cellulaire à leur avantage pour se répliquer et détruire les cellules tumorales [69]. En effet, l'apoptose, la réponse interféron, l'inhibition de

la synthèse protéique sont toutes des réponses abolies, défectueuses ou incontrôlées pour les cellules cancéreuses. Les virus peuvent donc en tirer avantage pour se répliquer et détruire celles-ci, pour ensuite répéter le processus dans les cellules cancéreuses avoisinantes [73], [74]. En revanche, les cellules normales ont des mécanismes de défense intacts, leur permettant de limiter la réplication virale.

Certains virus ont naturellement un tropisme tumoral, d'autres ont été génétiquement modifiés à cette fin. Les modifications génétiques servent en premier lieu à améliorer la spécificité des virus vis-à-vis des cellules tumorales, ainsi qu'à les rendre les plus inoffensifs possibles pour les tissus sains de l'hôte, en ciblant une molécule de surface particulière, en délétant certains gènes viraux nécessaires à la réplication dans les cellules saines, ou en utilisant des promoteurs viraux activables uniquement dans les cellules tumorales [75].

a) Entrée spécifique des virus dans les cellules tumorales

La première forme de ciblage est l'existence ou la création d'un tropisme d'entrée spécifique des cellules tumorales. C'est le cas par exemple du virus de la rougeole qui utilise le récepteur CD46, fortement exprimé sur les cellules tumorales, comme récepteur d'entrée. En effet les cellules tumorales surexpriment ce récepteur par rapport aux cellules saines pour échapper à la lyse dépendante du complément. Ainsi le tropisme de ce virus permet d'infecter préférentiellement les cellules tumorales plutôt que les cellules saines [76].

Plusieurs stratégies ont été développées pour créer et/ou améliorer le tropisme d'entrée des virus oncolytiques dans les cellules tumorales. Ces stratégies exigent des modifications des protéines de liaison des récepteurs présents sur les particules virales et sont bien illustrées par le cas des adénovirus (AdV). La fibre du penton des adénovirus se lie au récepteur CAR (coxsackie and adenovirus receptor) exprimé sur divers types cellulaires de façon inversement proportionnelle à la malignité des cellules [77]. Les adénovirus ont donc naturellement tendance à infecter de façon plus efficace les cellules normales que les cellules tumorales. Cependant, cette molécule peut être modifiée de façon à inverser ce rapport. Des anticorps bispécifiques ont été synthétisés pour lier la fibre à un récepteur très fortement exprimé dans les cellules transformées (comme le récepteur au facteur de croissance épidermique EGFR), ce qui augmente l'efficacité d'entrée des adénovirus dans ces cellules [78]. Ces anticorps permettent d'épargner les cellules non tumorales exprimant CAR [79].

Le virus de la rougeole peut aussi être génétiquement modifié pour améliorer son entrée spécifique dans les cellules tumorales en utilisant des stratégies similaires. En effet, la liaison au récepteur et la fusion membranaire chez le virus de la rougeole sont médiées par deux protéines, respectivement la protéine d'attachement H et la protéine de fusion F. L'ajout de domaines de spécificité, tels que des anticorps à chaîne unique, à l'extrémité carboxyle de la protéine d'attachement, permet la liaison aux récepteurs désignés. La fusion membranaire est obtenue par la protéine de fusion non modifiée. En revanche, l'entrée par l'intermédiaire des récepteurs naturels peut être abolie par des mutations dans la protéine d'attachement.

La modification du ciblage de l'herpèsvirus (HSV) a des points communs avec le virus de la rougeole. En effet, la glycoprotéine d'attachement D peut être modifiée en y attachant des ligands tels que l'interleukine-13 (IL-13) [80], l'urokinase [81], [82] ou des anticorps à chaîne unique, par exemple contre HER2 (human epidermal growth factor receptor 2), surexprimés par les cellules tumorales [83]. Cette stratégie permet de rediriger le HSV vers ces antigènes exprimés notamment par les gliomes et les tumeurs du sein[84].

b) Réplication sélective des virus dans les cellules tumorales

Les cellules tumorales ont éliminé ou inactivé plusieurs voies impliquées dans les mécanismes de contrôle de la croissance cellulaire, de l'apoptose ainsi que les mécanismes de résistance aux infections [56], permettant ainsi la réplication sélective des virus oncolytiques dans les cellules tumorales.

i. Voie de signalisation p53

La voie de signalisation impliquant le facteur de transcription p53 et/ou la protéine du rétinoblastome (RB) a été identifiée comme déficiente pour plusieurs types de cellules tumorales. Ainsi, les adénovirus oncolytiques ont été créés par une délétion dans le gène codant pour la protéine E1B qui leur permet de lier et d'inactiver la protéine pro-apoptotique p53. De ce fait, les cellules saines, qui sont infectées par ces virus, peuvent subir l'apoptose médiée par la p53, tandis que les cellules cancéreuses, qui inactivent communément la p53, restent sensibles à l'infection virale. Un exemple modèle de cette stratégie est l'adénovirus oncolytique Onyx-015 qui détient une mutation dans cette protéine et génère donc une réponse p53 conduisant à l'apoptose de la cellule lors de l'infection. Cependant, les cellules tumorales déficientes au niveau du gène p53 ne peuvent plus limiter la réplication virale[85]. Les virus ayant donc pour cibles des protéines pro-apoptotiques, comme les adénovirus,

peuvent être modifiés spécifiquement afin de se répliquer sélectivement dans les cellules cancéreuses souvent déficientes dans ces mécanismes d'induction de l'apoptose, cette mutation étant présente dans près de 50% des cancers[47].

ii. Voie de signalisation de l'interféron

Un autre défaut génétique fréquent des cellules cancéreuses se trouve au niveau de la voie de signalisation des interférons de type I (IFN) [86]. Les IFNs de type I sont essentiels pour les réponses antivirales et anti-tumorales car ils favorisent les réponses immunitaires pour l'élimination du virus, mais aussi parce qu'ils réduisent la prolifération cellulaire en activant la protéine p53 pro-apoptotique [87]. Plusieurs types de cancers inactivent cette voie, soit en réduisant l'expression de l'IFN de type I, soit en limitant ses signaux par l'expression réduite des récepteurs ou l'altération de la signalisation en aval. Ainsi, les virus oncolytiques présentent une spécificité pour les cellules et l'environnement tumoral, dans lequel les réponses IFN de type I sont déficientes ; au contraire, ils sont éliminés dans les cellules saines par des réponses médiées par l'IFN. Ceci sera plus précisément détaillé dans la partie IV.

Le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) est le meilleur exemple de virus extrêmement sensibles à l'IFN de type I. La protéine de matrice (M) de ce virus permet de bloquer l'exportation des ARN messagers et donc d'inhiber la sécrétion d'IFN de type I. Des mutations au niveau de cette protéine permettent donc la réplication du virus spécifiquement dans les cellules tumorales incapables de synthétiser ces cytokines [69], [88]. Il a également été démontré qu'une mauvaise régulation de la traduction, en plus des défauts de signalisation de l'IFN, contribuait fortement à la réplication du VSV [86], [89]. Parallèlement, le Virus de la maladie de Newcastle (NDV), semble lui aussi détenir des propriétés oncolytiques au moins en partie dépendantes de déficiences en IFN dans les cellules transformées [66], [90].

iii. Voie de signalisation de la protéine kinase R

Des déficiences de la voie de signalisation de défense cellulaire médiée par la protéine kinase R (PKR) peuvent également être exploitées par les virus oncolytiques. Dans les cellules saines, cette voie inhibe la réplication virale après la détection du virus. Un Herpès simplex virus-1 (HSV-1) oncolytique atténué, dans lequel le gène viral codant pour la protéine ICP34.5 (infected cell protein 34.5) est supprimé, induit la lyse préférentielle des

cellules tumorales par rapport aux cellules normales [49], [91]. Cette suppression rend l'HSV-1 incapable de bloquer la phosphorylation de la PKR, qui ne se réplique donc que dans les cellules avec une signalisation PKR défectueuse [92], anomalie fréquemment retrouvée dans le tissu tumoral[49].

iv. Voie de signalisation Ras

La voie de signalisation Ras régule de nombreux aspects de la tumorigenèse, comprenant la résistance à la mort cellulaire et la prolifération[93]–[95]. Les réovirus et le virus de la vaccine montrent une sélectivité naturelle pour les cellules cancéreuses avec une voie de signalisation Ras suractivée. Dans les cellules normales, le réovirus est capable de pénétrer dans la cellule et commence à produire des ARNs viraux, ce qui active la voie PKR. Une fois activée, la voie PKR va inhiber la traduction des protéines virales, ce qui empêche la production des particules virales et arrête la propagation du virus [96]. Toutefois, les cellules cancéreuses avec une voie Ras aberrante ne déclenchent pas la voie PKR. Ainsi, les cellules tumorales deviennent permissives à l'infection virale et, finalement, à la lyse cellulaire[93]. Les réovirus humains se multiplient préférentiellement dans les cellules possédant une voie de signalisation Ras active (soit environ 30 % des tumeurs)[97], [98]. Le virus de la vaccine, un membre de la famille des poxvirus, dépend lui de la signalisation Ras induite par le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) pour la réplication virale [94].

2. Induction d'une réponse immunitaire anti tumorale

Certains virus oncolytiques entraînent la destruction des cellules tumorales via l'induction d'une réponse immunitaire antitumorale spécifique ou non spécifique. La première observation de cet effet est venue de l'idée d'associer l'efficacité des virus oncolytiques à une immunité anti-tumorale spécifique en utilisant des lysats de cellules tumorales humaines infectées (appelés oncolysats) comme préparations thérapeutiques [99]. Ceci avait permis d'induire une réponse immunitaire de type humoral contre les antigènes viraux et les antigènes tumoraux révélés par l'infection virale [100]. Les meilleurs résultats avaient été obtenus dans la prévention de rechutes métastatiques de mélanomes traités avec un oncolysat de la souche 73T du virus de la maladie de Newcastle [101]. Par la suite, il a été montré que l'infection virale rétablit l'immunogénicité des cellules tumorales, qui sont pour la plupart naturellement très peu immunogènes du fait de la faible expression des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ou des médiateurs de la réponse

immunitaire (cytokines), en induisant ainsi une immunité anti-tumorale spécifique. Cette réponse immunitaire a été démontrée pour le HSV1. En effet, l'injection intra-tumorale de ce virus dans des tumeurs colorectales, de mélanome ou de neuroblastome chez la souris a entraîné la régression des tumeurs injectées et également des tumeurs non injectées, grâce à la génération de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques spécifiques d'antigènes tumoraux[102]. Cette réponse immunitaire anti-tumorale a permis la protection à long terme contre une éventuelle récurrence tumorale.

Ainsi, l'infection virale constitue un signal de danger capable de recruter des cellules de l'immunité et notamment les cellules dendritiques (DC). Dans le cas de la virothérapie anti-tumorale, les cellules tumorales lysées libèrent des antigènes associés aux tumeurs qui peuvent favoriser une réponse immunitaire adaptative induisant la régression de tumeurs éloignées non exposées directement aux virus. Elles libèrent également des molécules associées aux dommages cellulaires (DAMPs) tels que les HSP « Heat shock proteins » et HMGB1 « high-mobility group box 1 », ainsi que des cytokines (TNF α , IFN et IL-12). Ces éléments favorisent la maturation des cellules présentatrices d'antigène (CPA) telles que les DC. Ces CPA activent lymphocytes T CD4 + et CD8 + spécifiques des antigènes tumoraux. Les lymphocytes T CD8+, une fois activés, se différencient en cellules effectrices cytotoxiques ayant la capacité d'atteindre des sites de croissance tumorale, où ils reconnaissent et détruisent les cellules tumorales suite à la reconnaissance d'antigènes [47].

Ces différents effets sont susceptibles de renforcer l'action lytique propre du virus en favorisant la présentation d'antigènes tumoraux ainsi que l'activation d'une réponse immunitaire anti-tumorale accompagnée de l'infiltration de la tumeur par diverses cellules effectrices. Ces effets indirects semblent être une composante importante de l'efficacité thérapeutique des virus oncolytiques et plusieurs stratégies sont en développement pour en améliorer l'efficacité. La combinaison avec des inhibiteurs de point de contrôle immunitaire, ainsi que l'ajout de gènes immunostimulants pourraient améliorer l'efficacité thérapeutique de ces virus oncolytiques (**Figure 4**).

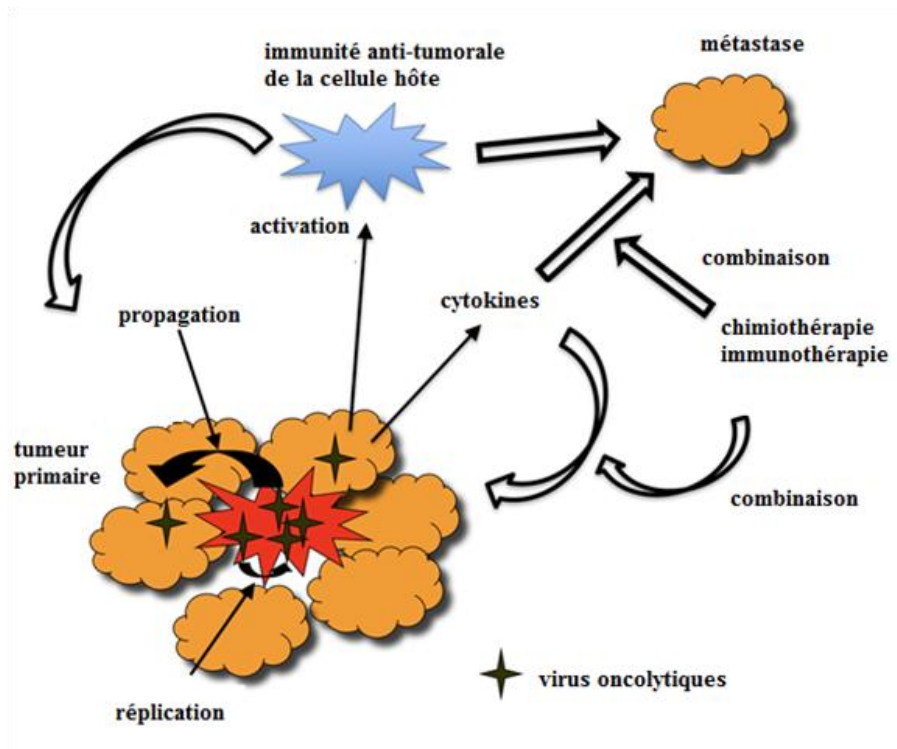


Figure 4. Mécanismes d'action des virus oncolytiques.

La réplication sélective des virus oncolytiques dans les cellules tumorales induit une immunité antitumorale spécifique qui agit sur des lésions éloignées. La combinaison avec les inhibiteurs de point de contrôle ou la chimiothérapie peut améliorer l'efficacité de la virothérapie antitumorale. L'armement de virus oncolytiques avec des gènes immunostimulateurs ou des gènes thérapeutiques contre le cancer peut également être bénéfique (Adapté de Fukuhara et al., 2016 [103]).

IV. Essais cliniques des virus oncolytiques

L'ensemble des études précliniques menées sur les virus oncolytiques apportent des arguments pour leur utilisation dans un cadre clinique. En 2016, environ 40 essais cliniques impliquant l'utilisation de plusieurs virus oncolytiques contre plusieurs types de cancer recrutent des patients, la plupart en phase initiale (**Tableau 3**). Dans cette partie, je vais présenter les propriétés détaillées des virus qui sont actuellement évalués en essais cliniques de phase III.

Virus	Fabricant	Modification	Nombre d'essais cliniques			Cancers
			Phase I	Phase II	Phase III	
Adénovirus						
Onyx-015	Onyx Pharmaceuticals	Chimère Type 2/5, délétion de E1B	6	6	0	Cancer de la tête et du cou, cancer du pancréas, cancer des ovaires, cancer colorectal, gliomes, métastases pulmonaires et métastases hépatiques
H101	Shanghai Sunwaybio	délétion E1B, délétion partielle E3	1	2	1	Carcinome épidermoïde et cancer de la tête et du cou
DNX-2401	DNAtrix	insertion de Δ 24-RGD	4	0	0	Glioblastome, cancer des ovaires
VCN-01	VCN Biosciences	insertion de PH20 hyaluronidase	2	0	0	Cancer du pancréas
Colo-Ad1	PsiOxus Therapeutics	Chimère Ad11/3 groupe B	1	2	0	Cancer du côlon, cancer du rein, cancer de la vessie et cancer des ovaires
ProstAtak	Advantagene	insertion deTK	4	1	1	Cancer du pancréas, cancer du poumon, cancer du sein, mésothéliome et cancer de la prostate
Oncos-102	Oncos Therapeutics	insertion Δ 24-RGD-GM-CSF	1	0	0	Cancers solides
CG0070	Cold Genesys	délétion GM-CSF et E3	1	1	1	Cancer de la vessie
Virus de la vaccine						
Pexa-vec (JX-594)	Jennerex Biotherapeutics	insertion GM-CSF, modification de TK	7	6	0	Mélanome, cancer du foie, cancer colorectal, cancer du sein et carcinome hépatocellulaire
GL-ONC1	Genelux	modification de TK, modification de l'Hémagglutinine, modification de F14.5L	4	1	0	Cancer du poumon, cancer de la tête et du cou, mésothéliome
Herpèsvirus						
T-VEC	Amgen	délétion ICP34.5, délétion US11, insertion GM-CSF	2	3	2	Mélanome, cancer de la tête et du cou et cancer du pancréas
G207	Medigene	délétion ICP34.5, modification UL39	3	0	0	Glioblastome
HF10	Takara Bio	délétion UL56	2	1	0	Cancer du sein, mélanome et cancer du pancréas
SEPREHVIR (HSV1716)	Virttu Biologics	délétion ICP34.5	5	1	0	Carcinome hépatocellulaire, glioblastome, mésothéliome,

						neuroblastome
OrienX010	OrienGene Biotechnology	délétion ICP34.5, délétion ICP47, insertion GM-CSF	1	0	0	Glioblastome
Réovirus						
Reolysin	Oncolytics Biotech	Aucune	15	9	0	Gliome, sarcomes, cancer colorectal, cancer de l'ovaire, mélanome, cancer pancréatique, myélome multiple, cancer de la tête et du cou
Virus de la vallée des Sénécas						
SVV-001	Neotropix	Aucune	3	1	0	Tumeurs neuroendocriniens, neuroblastome et cancer du poumon
Virus coxsackie						
Cavatak (CVA21)	Viralytics	Aucune	3	1	0	Mélanome, cancer du sein et cancer de la prostate

Tableau 3. Virus oncolytiques clés dans les essais cliniques.

(Adapté depuis Kaufman et al., 2015 [47]).

1. Le virus herpès simplex T-Vec

Le Talimogene Laherparepvec (T-VEC), virus oncolytique de l'herpès recombinant pour le GM-CSF, est le virus oncolytique pour lequel les études cliniques sont les plus avancées. Il est actuellement la propriété de la compagnie Amgen en Californie. Le T-VEC a été le premier virus oncolytique à recevoir l'approbation de la FDA (Food and Drug Administration) américaine fin octobre 2015 [38]. Il a depuis été approuvé par l'Union Européenne. Ce virus dérive du HSV-1 avec des délétions des gènes ICP34.5 et du gène ICP47.

L'ICP34.5 a pour rôle le blocage de la réponse antivirale de l'hôte basée sur la voie IFN-PKR et est donc requis pour l'infection des neurones par HSV-1 [104]. Pour le T-VEC, les deux gènes ICP34.5 sont supprimés, ce qui améliore la sélectivité du virus pour les cellules cancéreuses et empêche l'infection des neurones, réduisant ainsi de manière significative la pathogénicité du HSV-1. La délétion d'ICP47 restaure la présentation des antigènes viraux par les cellules saines et cancéreuses, ce qui conduit à la maîtrise de l'infection dans les tissus sains et à la destruction par le système immunitaire des cellules cancéreuses qui propagent de manière sélective le HSV-1 oncolytique. La délétion d'ICP47 induit également l'activation précoce du promoteur US11. Ce dernier bloque la phosphorylation de la PKR, empêchant ainsi les cellules cancéreuses de déclencher une

apoptose lorsqu'elles s'infectent [92]. Enfin, le gène codant pour le GM-CSF a été introduit dans le génome viral à la place des gènes de l'ICP34.5 pour améliorer l'induction d'une immunité anti-tumorale.

Des études préclinique sont démontré les effets lytiques puissants du T-VEC contre plusieurs lignées tumorales, notamment des cellules de cancer du pancréas et de mélanome [91]. Il a été évalué dans des essais cliniques avancés pour des patients atteints de tumeurs de la tête et du cou, de mélanome et de cancer du pancréas [47].

Des patients atteints de mélanomes non résecables de stade IIIC et IV ont été traités avec le T-VEC dans un essai clinique multicentrique de phase II. Une dose initiale de 10^6 pfu (plaque-forming units) de virus a été administrée par injection intra-tumorale, suivie trois semaines plus tard d'une injection de 10^8 pfu toutes les deux semaines jusqu'à obtenir une réponse clinique maximale, la progression de la maladie ou une toxicité inacceptable [105]. Cinquante participants ont été recrutés dans cette étude et un taux de réponse objective de 26% a été démontré, avec la plupart du temps des effets secondaires de faible grade incluant de la fièvre, de la fatigue et des réactions inflammatoires localisées aux sites d'injection.

Le T-VEC a ensuite été évalué dans un essai de phase III chez 436 patients atteints de mélanomes inopérables de stade IIIB, IIIC ou IV [106]. Un taux de réponse durable de 16,3% a été démontré (défini par une réponse objective commençant durant les 12 mois de traitement et persistant pour une durée d'au moins 6 mois) chez les patients ayant reçu le traitement T-VEC, comparativement à un taux de 2,1% chez les patients ayant reçu du GM-CSF seul ($P < 0,0001$) [107]. Ce résultat inclut les réponses de toutes les lésions, injectées et non injectées.

De plus, un taux de réponse objective de 26,4% a été enregistré, contre 5,7% pour les patients traités par le GM-CSF, dont 10,9% parvenant à une réponse complète. De plus, pour les patients ayant reçu le T-VEC, la médiane de survie globale a été améliorée (23,3 mois contre 18,9 mois pour les patients traités par le GM-CSF) [106]. Le traitement par le T-VEC a notamment été efficace chez les patients avec des tumeurs de stades III et IV M1a, ce qui suggère que T-VEC pourrait être particulièrement utile pour le traitement de patients à un stade où la maladie ne s'est pas encore étendue au niveau viscéral. Le traitement a été bien toléré, avec des effets indésirables comme de la fièvre, des nausées, de la fatigue, des

frissons, et des réactions inflammatoires localisées au niveau des sites d'injection. En se basant sur ces résultats extrêmement encourageants, la FDA américaine a autorisé la commercialisation du T-VEC pour le traitement des patients atteints de mélanomes métastatiques non opérables [38].

Le T-VEC est actuellement évalué chez les patients atteints de mélanome en combinaison avec des anticorps monoclonaux tels que l'ipilimumab (anti-CTLA-4) et le pembrolizumab (anti-PD1). Ces combinaisons semblent être plus appropriées pour les patients à des stades avancés et ayant subi des traitements lourds. Les données préliminaires de l'essai clinique de phase Ib qui étudie la combinaison du T-VEC et de l'ipilimumab, qui est un anticorps bloquant l'antigène cytotoxique des lymphocytes T 4 (CTLA-4) montrent des taux de réponse de 50%, avec un taux de réponse complète de 22% [108]. Un essai clinique randomisé en cours devra confirmer ces résultats.

2. L'adénovirus H101

Le virus H101, produit par Shanghai Sunway Biotech, a été approuvé pour le traitement du cancer du nasopharynx en Chine en 2005. C'est un adénovirus recombiné présentant une délétion des gènes E1B-55kDs et E3. Ces mutations confèrent au virus H101 des propriétés anti-tumorales [109]. Le H101 a été évalué dans un essai clinique randomisé de phase III chez 160 participants avec des carcinomes épidermoïdes avancés de la tête et du cou ou de l'œsophage [110]. Les patients ont été traités par chimiothérapie (cisplatine + 5-fluorouracile (5-FU) pour les patients n'ayant jamais reçu de chimiothérapie, ou adriamycine + 5-FU pour les patients précédemment traitées avec une chimiothérapie dérivée du platine) avec ou sans H101.

Une dose de virus de 5×10^{11} à 1.5×10^{12} particules virales a été administrée par injection intra-tumorale quotidiennement pendant 5 jours consécutifs toutes les 3 semaines. Les patients qui ont été traités avec le cisplatine / 5-FU et le virus H101 ont eu un taux de réponse de 78,8%, contre 39,6% seulement dans le groupe ayant reçu uniquement le cisplatine / 5-FU. De plus les patients traités avec l'adriamycine / 5-FU et le virus H101 et le groupe ayant reçu uniquement l'adriamycine / 5-FU ont eu un taux de réponse de 50%. Cependant, le nombre de patients dans ces groupes était relativement faible ($n = 18$). Une différence significative concernant le taux de réponse entre tous les patients ayant reçu le virus H101 par rapport aux patients traités par chimiothérapie seule a été noté. Les

principaux effets indésirables signalés dans cette étude comprenaient de la fièvre, des symptômes pseudo-grippaux et des réactions au site d'injection. En se basant sur ces résultats, l'organisme de réglementation chinois a approuvé le virus H101 pour le traitement du carcinome du nasopharynx en combinaison avec la chimiothérapie.

3. Reolysin

Le « Reovirus type 3 Dearing », aussi connue sous le nom de Reolysin®, est un réovirus oncolytique étudié dans plusieurs essais cliniques contre différents type de cancers. Ces essais sont effectués au Canada, aux États-Unis et au Royaume-Uni par la compagnie Oncolytics Biotech Inc., qui est basée à Calgary. L'administration du virus est souvent faite en combinaison avec un traitement anti-cancéreux conventionnel tel que la chimiothérapie. Plusieurs types de cancers sont ciblés tels que le mélanome, le cancer du poumon, le myélome multiple, le carcinome du sein, le cancer de la prostate, le carcinome du pancréas et les tumeurs solides pédiatriques[111].

Le Reolysin® est administré par voie intraveineuse, le plus souvent à une dose de 3×10^{10} TCID₅₀ (tissue culture infectious dose 50) aux jours 1 et 5 toutes les 3 ou 4 semaines. La plupart du temps, des symptômes s'apparentant à une grippe, une diarrhée ou une lymphopénie ont été notés. De plus, il ne semble pas y avoir de dose maximale toxique limite ou tolérée [112]. Dans les essais de phase II, il a été démontré chez plusieurs patients une stabilisation ou une régression de la taille des tumeurs [113].

Une autre étude de phase III avec le Reolysin® en combinaison avec la chimiothérapie pour les patients atteints de carcinomes de la tête et du cou vient de se terminer en 2014. Les résultats étaient plutôt encourageants puisqu'il a été observé une amélioration significative ($p=0.0072$) de survie, sans progression tumorale pour les cancers localisés. Cette étude a aussi montré une légère tendance concernant les régressions tumorales ($p=0.076$). En revanche, pour les cancers avec métastases, plusieurs patients ont malheureusement succombé à la maladie. Néanmoins, il a été confirmé qu'il y avait une régression des tumeurs dès la 6^{ème} semaine du traitement ($p=0.021$) [114].

4. Le virus de la vaccine JX-594

Le virus de la vaccine JX-594 est un autre agent oncolytique prometteur. Il s'agit d'un virus de la vaccine recombiné portant une délétion du gène de la thymidine kinase qui

permet l'amélioration du ciblage spécifique des cellules tumorales. Ce virus possède aussi le gène du GM-CSF humain afin d'améliorer la réponse immunitaire anti-tumorale. Il est actuellement évalué en essais cliniques par la compagnie Jennerex basée à San Francisco[115]–[117]. Trente patients atteints de carcinome hépatocellulaire avancé ont été inclus dans une étude randomisée avec escalade de dose. Ces patients ont reçu soit une faible dose de virus (10^8 pfu/ml ; n = 14), soit une forte dose (10^9 pfu/ml ; n = 16) par injection intra-tumorale dans cinq lésions ou moins aux jours 1, 15 et 29. Les résultats ont démontré que la médiane de survie était supérieure chez les patients ayant reçu la dose la plus élevée de virus (14,1 mois) par rapport aux patients traités avec la dose la plus faible (6,7 mois ; $P = 0,02$). En outre, un taux de réponse objective de 15%, comprenant les réponses pour des lésions non injectées, a été rapporté, selon les critères RECIST (Critères d'évaluation de la réponse pour les tumeurs solides) modifiés. Cependant, ce taux est similaire pour les deux doses de virus. Ces données ont été utilisées pour justifier un essai clinique de phase III [115].

Partie III. Le virus de la rougeole

I. Description de la maladie

La rougeole est l'une des maladies infectieuses les plus contagieuses causées par le virus de la rougeole (measles virus, MV). Aujourd'hui, il s'agit toujours d'une des plus grandes causes de morbidité et mortalité dans le monde malgré le fait qu'elle soit souvent considérée à tort comme une maladie bénigne. En effet, malgré l'existence d'un vaccin très efficace, la rougeole reste une cause importante de décès du jeune enfant. On estime que 114 900 personnes, dont une majorité d'enfants de moins de cinq ans, sont mortes suite à l'infection par le virus de la rougeole en 2014 [118]. 95% des décès surviennent dans des pays en voie de développement dans lesquels les infrastructures sanitaires sont déficientes et sont dus à l'immunosuppression induite par l'infection.

Le virus de la rougeole est un morbillivirus hautement pathogène de la famille des Paramyxoviridae. Le seul réservoir du virus de la rougeole est l'homme. La transmission du virus de la rougeole se fait par des gouttelettes de toux provenant du tractus respiratoire d'un individu contaminé, transportant le virus jusqu'à un individu susceptible de développer la maladie. Cette maladie est très contagieuse puisqu'une personne contaminée peut infecter entre 12 à 18 personnes, justifiant une large campagne de vaccination visant à l'éradication du virus. Les personnes qui guérissent de la rougeole sont immunisées à vie.

La rougeole est caractérisée par une période de latence (10-14 jours) et les premiers symptômes sont peu caractéristiques : état fébrile suivi de l'éruption cutanée permettant de diagnostiquer la maladie et marquant le pic de l'infection. L'infection par le virus de la rougeole entraîne le déclenchement d'une réponse immunitaire efficace permettant l'élimination du virus et une immunisation à vie. Paradoxalement, elle induit une immunosuppression transitoire (de une à six semaines) mais très sévère dans les semaines suivant l'élimination du virus. Au niveau cellulaire, l'immunosuppression induite par le virus est caractérisée par une réduction du nombre de lymphocytes T et la dérégulation de la fonction des cellules dendritiques.

Le virus de la rougeole entre au niveau des voies respiratoires, puis rejoint les ganglions lymphatiques les plus proches. Ce sont les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules de Langerhans résidant dans le tractus respiratoire qui sont les premières cibles de l'infection. En effet, à l'état immature, ces cellules n'expriment aucun des récepteurs du virus (Nectin-4 et CD150/SLAM). Le virus s'adsorbe donc dans un premier temps à la molécule DC-SIGN, une lectine de type-C exprimée par ces cellules. L'attachement de la protéine H du MV induit une expression membranaire locale de la molécule CD150, ce qui permet au virus d'entrer dans la cellule [119]. Ensuite, la transmission du virus aux lymphocytes T est favorisée par l'infection des DC. En effet, *in vitro*, les DC infectées interagissent avec les lymphocytes T grâce à la formation d'une synapse impliquant l'interaction de la protéine virale H dans les DC avec le récepteur du MV sur les lymphocytes T [120]. Le virus se réplique ainsi dans les ganglions lymphatiques conduisant à une première virémie. Le virus se propage ensuite dans le thymus et les organes lymphoïdes secondaires telle que la rate et les amygdales, mais aussi dans d'autres organes comme les poumons, le foie et les reins, provoquant une virémie secondaire responsable d'une immunosuppression aiguë [121]. Dans le sang périphérique, les monocytes constituent la majorité des cellules infectées [122]. Dans les poumons, les macrophages alvéolaires sont les cibles préférentielles pour la réplication du virus [123]. Le virus infecte également les cellules épithéliales dans le tractus respiratoire par le récepteur Nectin-4 [124].

L'immunosuppression transitoire induite par le virus de la rougeole entraîne le développement d'infections par des micro-organismes pathogènes opportunistes qui sont à l'origine de la plupart des décès faisant suite à la rougeole. Les complications les plus graves sont des infections respiratoires, des encéphalites, des diarrhées sévères, des pneumonies ou des otites. Enfin, dans certains cas, l'élimination du virus peut ne pas être totale et le virus peut persister au niveau du système nerveux central entraînant à terme une maladie appelée panencéphalite sclérosante subaiguë (PESS) [125]. La PESS est une dégénérescence du système nerveux central très rare mais toujours mortelle parce qu'il n'existe aucun traitement efficace et que le mécanisme de sa pathogenèse reste inconnu.

Le développement d'une réponse immunitaire est nécessaire à la guérison. La réponse immunitaire innée se développe dans un premier temps en faisant intervenir la production d'interféron- α et - β [126]. Néanmoins, l'élimination du virus nécessite le développement d'une réponse immunitaire adaptative humorale et cellulaire. Les anticorps sont produits

contre toutes les protéines virales mais seulement les anticorps contre l'hémagglutinine H sont neutralisants. En effet, les anticorps développés contre la protéine F ne sont pas neutralisants mais jouent un rôle important en limitant la propagation du virus [127]. La réponse immunitaire adaptative cellulaire se traduit par le développement d'une immunité lymphocytaire T CD4⁺ et CD8⁺ spécifique de la rougeole, associée à une élévation de la concentration plasmatique en IL-2, interféron- γ et IL-4.

II. Les différentes souches du virus de la rougeole

La première souche de MV isolée en 1954 par Enders et Peebles a été obtenue à partir d'un patient, David Edmonston, qui a donné son nom à la "Souche Edmonston". L'isolation de la souche Edmonston a permis de dériver deux souches atténuées du virus MV : Edmonston A et Edmonston B (**Figure 5**). Par la suite, d'autres souches plus atténuées ont été générées à partir de cette souche sauvage, dont la souche Schwarz, après passage sur différents types cellulaires tels que des fibroblastes d'embryon de poulet, des cellules épithéliales humaines de rein, ou encore des cellules Véro dérivées de rein de singe. Depuis 1975, la souche Schwarz est la plus largement utilisée comme vaccin. Elle a été obtenue en 1962 par des passages sur cultures de fibroblastes d'embryon de poulet de la souche Edmonston-Enders. L'administration de la souche Edmonston B, utilisée jusqu'alors provoquait souvent une fièvre trop importante a donc été remplacée par la souche Schwarz, plus atténuée. Elle est à présent la souche vaccinale standard pour la vaccination dans le monde [128].

On constate que les souches vaccinales sont plus robustes vis-à-vis du passage cellulaire par rapport aux souches sauvages. En effet, elles restent stables génétiquement [129]. L'analyse comparative des séquences des génomes entre la souche sauvage Edmonston et la souche Schwarz met en évidence une variation de 42 nucléotides[130]. Plusieurs mutations sont apparues dans les protéines virales, contribuant à l'atténuation de la virulence du virus. De plus, suite aux passages sur des cellules n'exprimant pas le récepteur CD150/SLAM, les souches ont évolué et acquis la capacité à utiliser la molécule CD46 comme récepteur, grâce à la mutation N481Y dans l'hémagglutinine.

La souche Schwarz présente de nombreux avantages qui justifient son usage dans le cadre de la vaccination de jeunes enfants ; elle présente une stabilité génétique importante

puisque aucune réversion vers une forme pathogène n'a jamais été observée. De plus, elle induit des réponses immunitaires cellulaires et humorales à long terme [131].

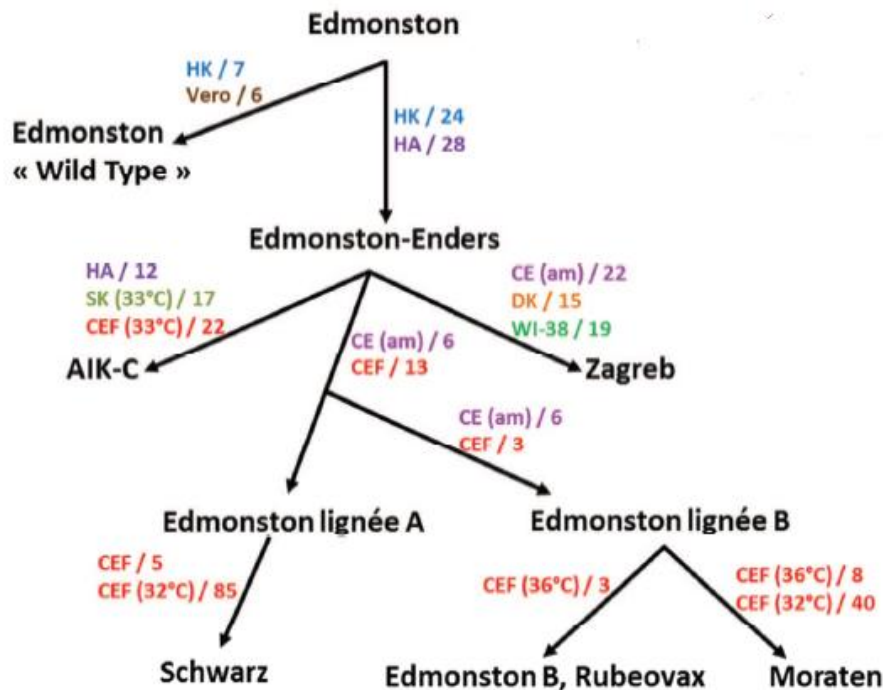


Figure 5. Dérivation des souches vaccinales du virus de la rougeole à partir de la souche Edmonston sauvage originale.

Le type de cellules utilisées pour leur adaptation ainsi que le nombre de passages sont indiqués en couleur. CAM, chorioallantoic of chick embryo; CE (am), intra-amniotic cavity of chick embryo; CEF, chick embryo fibroblast; DK, dog kidney; HA, human amnion; HK, human kidney; SK, sheep kidney; WI-38, human diploid cells (adapté de Parks et al., 2001 [132]).

III. Structure du virus et cycle de réplication

Le virus de la rougeole est un virus enveloppé. Son génome est un ARN simple brin de polarité négative. Il appartient au genre des *Morbillivirus*, à la famille des *Paramyxoviridae*. Les particules virales sont pléiomorphiques, généralement sphériques, avec une variabilité de taille allant de 100 à 300 nm de diamètre [133]. Le génome MV contient 6 gènes codant pour six protéines structurales composant la particule virale et pour deux protéines non-structurales nommées V et C (**Figure 6**). L'ordre des 6 gènes est, sur le brin positif, N-P/V/C-M-F-H-L, chaque lettre représentant une protéine. Dans le gène codant pour P, il y a un changement de cadre de lecture lors de la traduction, ce qui permet de former les 3 protéines P, V et C.

L'ARN du virus est compacté dans une ribonucléoprotéine hélicoïdale, ou nucléocapside, comprenant la nucléoprotéine N et l'ARN polymérase ARN-dépendante composée de la phosphoprotéine P et de la protéine L (**Figure 6**). Ce complexe est recouvert d'une enveloppe lipidique provenant de la cellule hôte à partir de laquelle le virus a bourgeonné. Sur la face interne de cette enveloppe se trouvent des protéines de la matrice M créant une interface entre l'enveloppe virale et le cœur du virion. Deux glycoprotéines sont enchâssées dans la membrane : l'hémagglutinine H qui permet l'attachement du virus à un récepteur cellulaire et la protéine de fusion F assurant la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique. Les deux protéines non structurales V et C permettent la suppression des réponses immunitaires de la cellule hôte et constituent des facteurs de virulence pour le virus.

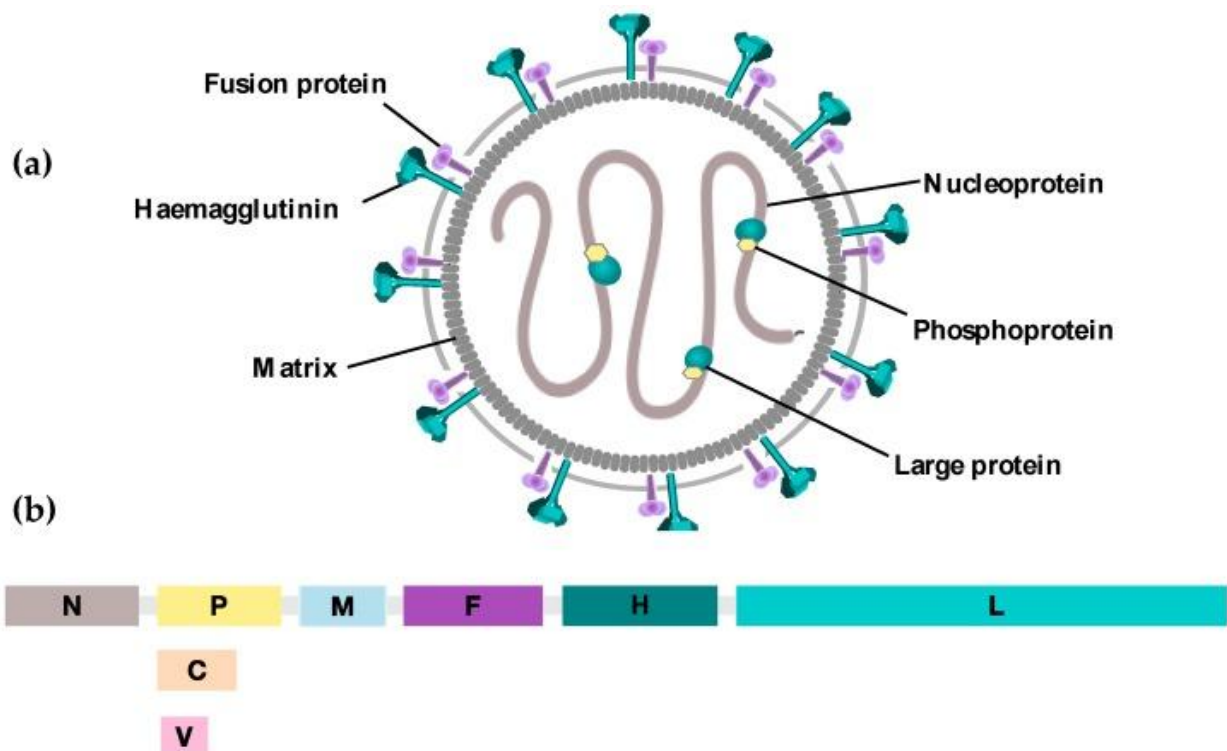


Figure 6. Représentation schématique de a) la structure d'une particule virale et b) de l'organisation du génome du virus de la rougeole.

Le génome du virus de la rougeole est un ARN négatif codant pour les protéines N,P,V, C, M,F, H et L [134].

Le cycle de réplication du MV se divise en différentes étapes successives. Tout d'abord, le virus se fixe à un récepteur cellulaire (CD150, CD46, Nectin-4) par le biais de

l'hémagglutinine. L'interaction entre l'hémagglutinine et les récepteurs spécifiques provoque un changement de conformation de la protéine F, permettant l'insertion du domaine de fusion dans la membrane de la cellule hôte. Le résultat de cette étape essentielle est l'entrée du génome viral et des protéines qui lui sont associées dans le cytoplasme de la cellule infectée [135]. La transcription du génome viral est initiée par un promoteur unique situé à l'extrémité 3'du génome et est assurée par l'ARN polymérase ARN-dépendante constituée des protéines L et P.

La réplication du génome nécessite la synthèse d'un anti-génome complet à polarité positive qui servira par la suite à la synthèse de l'ARN génomique viral. Suite à la réplication du génome viral, la synthèse et l'assemblage des protéines virales, les virions vont bourgeonner de la membrane plasmique pour conclure le cycle. Cependant, le bourgeonnement n'est pas le seul mécanisme de transmission du MV. Grâce à l'interaction des protéines virales H et F exprimées sur la membrane de la cellule infectée avec les cellules voisines, infectées ou non et exprimant le récepteur du MV, il en résulte la formation de cellules multinucléées géantes appelées syncytia. Ces fusions peuvent impliquer de nombreuses cellules et il est donc possible d'observer une centaine de noyaux dans un seul syncytium. Cet effet cytopathique caractéristique permet la propagation de l'infection et contribue aussi largement aux propriétés oncolytiques des souches atténuées du virus de la rougeole[130].

IV. Récepteurs cellulaires du virus de la rougeole

A ce jour, trois récepteurs cellulaires ont été identifiés permettant l'entrée du MV : la protéine CD150 aussi appelée SLAM (Signaling Lymphocyte Activation Molecule)[136], utilisée par la souche sauvage du virus de la rougeole. Les souches atténuées dérivées de la souche Edmonston ont conservé la capacité à cibler la molécule CD150/SLAM mais elles sont aussi capables d'utiliser la molécule CD46 comme récepteur d'entrée [137], [138]. Récemment, un troisième récepteur du MV, la Nectin-4, a été identifié [139], [140] comme étant un récepteur des souches vaccinales et sauvages du virus de la rougeole (**Figure 7**).

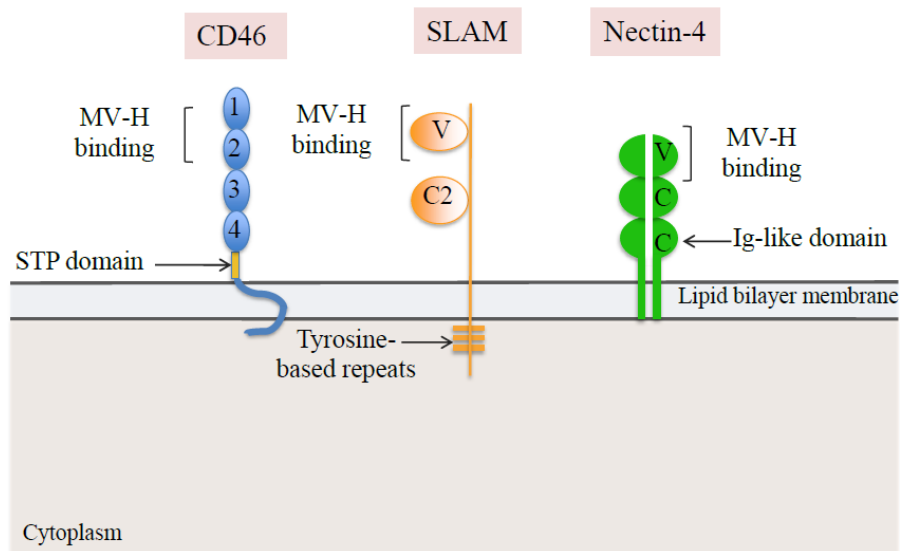


Figure 7. Récepteurs cellulaires identifiés pour le MV.

STP domain: domaine riche en sérine-thréonine-proline; V: domaine variable; C: domaine constant ; les numéros 1-4 représentent des séquences courtes répétées (SCR) [138].

1. La molécule CD46 (membrane cofactor protein ou MCP)

La molécule CD46 est le premier récepteur du MV à avoir été identifié [137]. Seules les souches atténuées se lient à ce récepteur, grâce à la protéine H qui possède une forte affinité pour CD46, ce qui n'est pas le cas de la protéine H des souches sauvages [141]. La protéine H des souches atténuées diffère de celle des souches sauvages par la substitution de quelques acides aminés (valines et tyrosine en positions 451 et 481) suite aux passages sur des cellules n'exprimant pas le CD150/SLAM.

CD46, aussi appelée *Membrane Cofactor Protein* (MCP), a été identifié initialement pour son rôle dans la régulation du complément. Elle est exprimée à faible densité de manière ubiquitaire par toutes les cellules nucléées de l'organisme[142]. Son rôle est de bloquer la cascade d'activation du complément au niveau de la composante C3. Son expression à faible densité protège ainsi les tissus sains d'une activation accidentelle du complément. La molécule CD46 possède un domaine extracellulaire comportant quatre séquences courtes répétées ou « *short consensus repeats* », SCR1-4, en position N-terminale. Le site de fixation de la glycoprotéine H chevauche la jonction SCR1-SCR2.

En plus du virus de la rougeole, la molécule CD46 peut aussi être reconnue par d'autres types de pathogènes dont l'herpesvirus HSV-6, certains sérotypes d'adénovirus,

2. La molécule CD150/ SLAM

La souche sauvage du virus MV utilise comme récepteur d'entrée la molécule SLAM, aussi appelée CD150 [136]. CD150 est exprimé par de nombreuses cellules immunitaires, notamment les macrophages, les cellules dendritiques matures, les lymphocytes B et T activés, les thymocytes immatures et les lymphocytes T mémoires, ce qui explique le lymphotropisme primaire du virus. La souche sauvage du virus MV présente un tropisme particulier pour ces cellules dans lesquelles, elle prolifère activement. Ces cellules sont par ailleurs impliquées dans la propagation du virus dans l'organisme.

La molécule CD150 est une petite glycoprotéine transmembranaire de type I avec deux domaines d'immunoglobuline C2 et V. La glycoprotéine H du virus de la rougeole se fixe sur le domaine V, quelle que soit la souche utilisée[136].

3. La Nectin-4

En 2011, la Nectin-4 a été identifiée simultanément par deux équipes comme un récepteur des souches vaccinales et sauvages du virus de la rougeole sur les cellules épithéliales [139], [140]. En effet, les cellules épithéliales du tractus respiratoire sont des cibles préférentielles de l'infection par le MV [124]. Cependant, ces cellules expriment aussi la molécule CD46, qui peut servir de récepteur pour les souches atténuées du MV, mais n'expriment pas la molécule CD150/SLAM, le récepteur des souches sauvages. Ceci suggérerait donc l'existence d'un troisième récepteur pour le MV permettant aux souches sauvages d'infecter les cellules épithéliales.

La Nectin-4 est une protéine transmembranaire de la superfamille des immunoglobulines. Elle est impliquée dans les jonctions adhérentes entre les cellules épithéliales qui permettent de maintenir l'adhésion entre ces cellules. Cette molécule est fortement exprimée dans le placenta et la trachée, mais elle est retrouvée à faible densité au niveau de l'épithélium des voies respiratoires. Ceci permet l'infection des cellules épithéliales par leur pôle basolatéral qui est à l'origine de la dissémination du virus sauvage de la rougeole. La découverte de ce récepteur a contribué à l'explication de l'épithéliotropisme secondaire du virus, favorisant ainsi la compréhension de la pathogenèse de la rougeole.

Cette protéine est décrite à l'origine comme un récepteur du poliovirus (PolioVirus Receptor-Like protein 4 - PVRL-4) [144]. Elle est composée d'un domaine extracellulaire comprenant trois domaines immunoglobulines (un domaine V et deux domaines C). La protéine H du MV interagit avec le domaine immunoglobuline V. Récemment, la protéine Nectin-4 a également été décrite comme surexprimée par certains types de cancers, notamment les cancers du sein, du poumon, du côlon et de l'ovaire [145]–[147]. En effet, elle intervient dans la transformation tumorale en favorisant les interactions entre les cellules tumorales [148]. Cette surexpression de la Nectin-4 par les cellules tumorales pourrait donner un avantage sélectif aux souches vaccinales du virus de la rougeole permettant de les cibler spécifiquement et d'exercer leur pouvoir oncolytique.

V. Utilisation du virus de la rougeole atténué comme virus oncolytique

Dans les années 1970, des études de cas ont décrit la régression spontanée de tumeurs associée à une infection par le virus de la rougeole, en particulier dans les hémopathies malignes. Cependant, le virus de la rougeole provoque une maladie grave chez l'homme, nécessitant la vaccination généralisée pour sa prévention. Ceci limite donc l'utilisation du virus de type sauvage comme agent thérapeutique oncolytique. Les souches vaccinales du MV sont néanmoins plus sûres. Elles ont un certain nombre de propriétés intéressantes pour une utilisation thérapeutique dans des stratégies anticancéreuses. Ces souches présentent naturellement un tropisme préférentiel pour une multitude de cellules tumorales grâce à la surexpression du récepteur CD46 par ces cellules. Ceci se traduit par une lyse directe des cellules tumorales infectées et par l'induction d'une réponse immunitaire à leurs rencontre.

Les souches vaccinales de MV ont été administrées à plus d'un milliard de personnes au cours des 40 dernières années, dans le cadre d'un programme de vaccination mondial. En conséquence, la sécurité de son administration n'est plus à justifier. De plus, le génome du virus MV a été largement étudié pour ses modifications génétiques afin d'augmenter l'efficacité et la traçabilité du virus. Son génome est parmi les génomes les plus stables des virus à ARN. En effet, aucun cas de réversion d'une souche vaccinale vers des formes pathogènes n'a jamais été observé. L'ensemble de ces propriétés fait du virus atténué de la rougeole un virus oncolytique prometteur pour l'utilisation en virothérapie antitumorale.

1. Ciblage spécifiques des cellules tumorales

a) Surexpression des récepteurs

La sélectivité de l'infection des souches vaccinales du virus de la rougeole pour les cellules tumorales est primordiale pour son utilisation comme agent thérapeutique. En effet, les souches vaccinales du virus de la rougeole dérivées de la souche Edmonston se lient préférentiellement au récepteur CD46. Il a été décrit que la molécule CD46 était surexprimée dans de nombreux cancers [149] pour échapper à la lyse dépendante du complément (Complement-Dependent Cytotoxicity - CDC). Cette surexpression par les cellules tumorales les rend donc plus susceptibles à l'infection par les souches vaccinales du virus de la rougeole que les cellules saines. Ainsi, il a été démontré que l'infection des cellules tumorales par le virus atténué de la rougeole augmentait progressivement avec la densité d'expression de CD46. En dessous d'une certaine densité, l'infection par le MV n'est pas efficace. De cet fait, l'effet cytopathogène de l'infection par le virus MV et la formation des syncytia (cellules géantes multinucléées) entre les cellules infectées et leurs voisines non-infectées est régulée par un effet de seuil [150]. Par ailleurs, les tissus sains ne représentent pas un lieu de réplication adéquat pour les souches atténuées du MV.

De plus, des études récentes ont démontré que les souches atténuées du virus MV conservent leur capacité à utiliser le récepteur CD150 /SLAM. Ainsi, la lyse des cellules primaires de lymphome et des xénogreffes par le MV dépend du récepteur CD150 /SLAM et n'était pas corrélée aux niveaux d'expression de CD46 [151].

Le récepteur Nectin-4 est exprimé à des niveaux faibles à modérés dans les cellules épithéliales respiratoires. Plusieurs études ont démontré son surexpression par certains types de cancers [146], [147]. Ainsi, il a été démontré que la surexpression de la Nectin-4 par les cellules d'adénocarcinome humain augmente l'activité antitumorale du MV [152].

b) Défauts de la réponse IFN de type I

De nombreuses études précliniques ont montré que les souches atténuées du virus MV sont capables de cibler la molécule CD46 et présentent effectivement une forte spécificité envers une grande variété de cellules tumorales humaines. Cependant, le rôle de cette surexpression dans le succès des essais cliniques de phase I n'est pas clair. Une étude sur le neuroblastome démontre que l'évolution du cancer n'est pas reliée à la surexpression du CD46, mais le virus de la rougeole atténué est toujours capable d'infecter ces types de

cellules cancéreuses [153]. Il est donc probable que d'autres facteurs peuvent influencer, en plus de la surexpression des récepteurs cellulaires spécifiques du MV, l'activité anti-tumorale préférentielle du MV, tels que des défauts de la réponse Interféron type I. Les défauts au niveau de la voie de signalisation des interférons de type I [86], [88], fréquemment observés dans les cellules tumorales, pourraient en effet être exploités par le virus de la rougeole. Une étude récente a examiné les réponses antivirales à l'infection par le MV des lignées tumorales de sarcome et a démontré une inhibition de la réplication virale dans les lignées résistantes à l'infection associée à une forte régulation positive des détecteurs intracellulaires du virus RIG-I et l'ISG (Interferon-stimulated gene) IFIT1 (Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1). En revanche, les lignées sensibles ont démontré une plus faible expression d'IFIT1, qui peut être corrigée par l'administration d'IFN- β exogène, ce qui suggère que les différences dans la réponse interféron type I peuvent expliquer les différences de sensibilité des cellules tumorales au MV dans ce modèle [154].

2. Essais précliniques

Plusieurs études précliniques ont démontré les propriétés oncolytiques des souches vaccinales du virus de la rougeole (Schwarz et Edmonston) *in vitro* et *in vivo* essentiellement avec des souris immuno-déficientes portant des xénogreffes de cellules tumorales humaines.

Les résultats précliniques récents obtenus avec les souches oncolytiques du virus MV sont extrêmement encourageants. Ainsi, l'effet oncolytique de MV a été évalué et démontré *in vivo* dans des modèles précliniques pour environ 20 types de cancers différents [45], incluant des cancers multi-résistants disséminés tels que le lymphome [155], le myélome [156], le médulloblastome [157], le glioblastome multiforme [158], le cancer de la prostate [159], le cancer du sein [160] et le cancer de l'ovaire [161]. Plusieurs voies d'administration ont été étudiées (intratumorale, intraveineuse, intrapéritonéale ou intrapleurale). Une ou plusieurs doses ont été administrées dans ces modèles. L'effet cytopathique caractéristique du virus, impliquant la formation d'agrégats de cellules multinucléées, a été observé dans les tumeurs des animaux traités, suivie de la mort par apoptose des cellules tumorales infectées.

L'obstacle majeur pour l'étude de l'activité oncolytique du MV *in vivo* dans un modèle immunocompétent afin d'évaluer l'impact du système immunitaire sur l'administration systémique du MV vient de l'incapacité du virus MV à infecter les cellules

murines, puisque son seul hôte naturel est l'homme, contrairement au VSV ou au virus de la vaccine. Pour cela, des modèles immunocompétents hCD46/IFNAR^{-/-} ont été générés. Ces souris transgéniques expriment le récepteur CD46.

3. Modifications génétiques du virus de la rougeole

Avec les avancées récentes en biologie moléculaire et en génétique, il devient plus simple de manipuler les virus afin d'avoir un traitement plus ciblé (**Figure 8**). Ainsi, les travaux menés ces dernières années évaluent le potentiel oncolytique de MV génétiquement modifiés, présentant une meilleure spécificité envers les cellules tumorales et une efficacité lytique potentialisée.

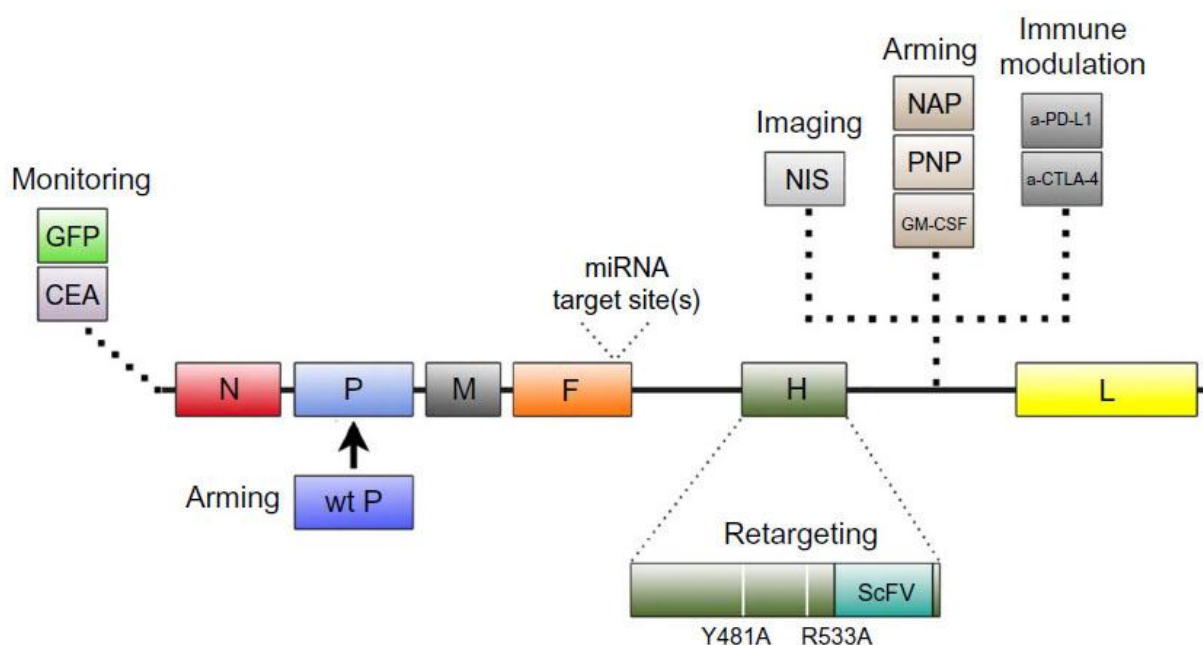


Figure 8. Les modifications génétiques de la souche MV-Edmonston.

L'emplacement des gènes insérés dans le génome est représenté. Les contributions fonctionnelles des modifications sont également décrites.

GFP = green fluorescent protein, CEA = carcinoembryonic antigen, wt P = wildtype phosphoprotein, NIS = sodium iodide symporter, NAP = neutrophil activating protein, PNP = purine nucleoside phosphorylase, GM-CSF = Granulocyte macrophage colony-stimulating factor, and ScFV = single-chain antibody [162].

a) Amélioration de l'activité lytique

L'infection par le virus de la rougeole entraîne la fusion de la cellule infectée avec des cellules voisines pour former des cellules géantes multinucléées (syncytia). Les cellules

infectées meurent ensuite par apoptose [163]. Des modifications génétiques peuvent être apportées pour augmenter les propriétés oncolytiques du virus de la rougeole. Ainsi, une approche développée pour augmenter l'efficacité lytique du MV consiste à remplacer le gène P muté dans la souche vaccinale avec un gène P de type sauvage. Contrairement au virus sauvage, les souches atténuées du virus de la rougeole sont moins efficaces pour bloquer la réponse anti-virale IFN de type I. En effet, lors du processus d'atténuation, des mutations surviennent dans différentes protéines virales, notamment la protéine V, rendant les souches vaccinales du MV sensible à l'IFN [164], [165]. En conséquence, les cellules tumorales infectées par les souches vaccinales du MV produisent sensiblement plus d'IFN que celles infectées par la souche sauvage. Dans une étude de Haralambieva *et al.*[166], l'activité anti-tumorale d'un virus recombinant MV-GFP armé du gène P de type sauvage a été évaluée *in vitro* et *in vivo*. Ce virus recombinant induit des niveaux significativement inférieurs d'IFN de type I que le MV-GFP non modifié et montre une plus grande efficacité oncolytique contre plusieurs xénogreffes de myélome humain. Les essais cliniques de ce virus recombinant n'ont pas été poursuivis en raison de la pathogénicité potentielle associée à la protéine P sauvage.

b) Combinaisons thérapeutiques

De nombreuses études précliniques ont démontré l'intérêt d'associer une thérapie virale par le MV à une chimiothérapie ou une radiothérapie.

i. La chimiothérapie

Des stratégies de chimiovirothérapie ont été développées pour augmenter la capacité des virus oncolytiques à détruire directement les cellules tumorales[167]–[169], notamment par l'insertion de « gènes suicides » codant pour des protéines rendant les cellules plus sensibles à l'apoptose ou à la thérapie avec d'autres médicaments. Le but commun de ces stratégies est de diminuer la toxicité systémique en administrant de faibles doses de médicaments chimiothérapeutiques peu toxiques et qui ne sont convertis en métabolites hautement toxiques que dans le microenvironnement de la tumeur.

Pour le virus de la rougeole, son génome a été modifié de façon à exprimer des gènes suicides codant pour des enzymes « prodrug convertase » capables de convertir des molécules chimiques inertes en molécules cytotoxiques. Ainsi, dans un modèle de gliome, un virus de la rougeole recombinant pour la purine nucléoside phosphorylase (PNP)

d'*Escherichia coli* a été développé. Cette enzyme est capable de convertir le 6-méthylpurine-2'-déoxyriboside (MeP-dR) en 6-méthylpurine (MeP). Cette molécule hautement diffusible est ensuite métabolisée en un analogue toxique de l'Adénosine Tri-Phosphate (ATP) qui inhibe immédiatement la synthèse des ADN, ARN et protéines, induisant la mort cellulaire [170]. Des études ont démontré la puissance de cette stratégie, puisque un faible niveau d'expression de la PNP dans la tumeur permet la mort des cellules tumorales induite par la prodrogue. Ainsi, suite à l'injection intra-tumorale ou systémique dans un modèle murin syngénique de cancer du côlon, ce MV-PNP interfère avec la progression tumorale et augmente la survie des souris après l'administration de la prodrogue MeP-Dr [171].

Une autre équipe a généré un virus de la rougeole recombinant pour une enzyme bactérienne, la super-cytosine désaminase (SCD), capable de convertir la 5-fluorocytosine (5-FC) en 5-Fluorouracil (5-FU), un agent chimiothérapeutique approuvé cliniquement, qui est ensuite métabolisé par la cellule infectée en 5-Fluorouridine-mono phosphate (5-FUMP). Le 5-FUMP interfère avec les processus de réparation de l'ADN et inhibe la synthèse de l'ADN et des ARN[172]. Cette stratégie a démontré son efficacité chez la souris dans des xénogreffes de carcinome hépatique[172], de mélanome [173]et de cancer squameux de la tête et du cou[174]. Les auteurs ont démontré une action synergique entre l'effet lytique du virus et cette substance chimiothérapeutique (**Tableau 4**).

Ces stratégies de chimiovirothérapie apportent un bénéfice thérapeutique supérieur à celui obtenu avec le virus seul et sont prometteuses pour de futures applications cliniques

ii. La radiothérapie

La radiothérapie peut également avoir un effet synergique en augmentant la réplication virale. Le groupe de S.J. Russell (Mayo Clinic) a notamment développé un MV recombinant pour le symporteur Iode/Sodium (MV-NIS)[156]. L'utilisation de ce virus MV-NIS permet de combiner l'effet cytopathique du MV avec les propriétés ionisantes de l'Iode 131 (¹³¹I).

La fonction physiologique normale du le symporteur Iode/Sodium (NIS) est le transport des ions iodure dans les cellules, ce qui a lieu principalement dans la thyroïde mais également dans les glandes mammaires, l'estomac et les glandes salivaires [175], [176]. Lorsque le NIS est exprimé à partir du génome du virus MV oncolytique, les cellules

tumorales infectées expriment le symporteur NIS et concentrent l'¹³¹I, un émetteur de particules β. Les particules β émises par la dégradation de l'¹³¹I pénètrent les tissus environnants jusqu'à 400 μm de leur point d'émission, produisant un effet "bystander" local sur les cellules voisines résistantes à l'infection par le virus, comme démontré dans un modèle de xénogreffes de mélanome humain chez la souris[156].

Cette stratégie a mis en évidence la destruction synergique de la tumeur dans plusieurs modèles précliniques de lymphome [151], de cancer de l'ovaire[177], de myélome [178] et de mésothéliome [179]. L'expression du symporteur Iode/Sodium permet aussi de visualiser et de quantifier la réplication du virus *in vivo* en utilisant un autre isotope de l'iode : l'iode 123 (¹²³I). Des essais cliniques de phase I utilisant un virus de la rougeole exprimant le NIS ont débuté pour le cancer de l'ovaire, le myélome, le mésothéliome et les cancers de la tête et du cou [84].

c) Amélioration de l'immunogénicité

L'induction de réponses immunitaires anti-tumorales est primordiale pour l'activité oncolytique du MV. Ainsi, plusieurs études suggèrent que le potentiel thérapeutique du virus MV codant pour des protéines immunostimulatrices permet le recrutement de cellules immunitaires anti-tumorales agissant en synergie avec l'action lytique du MV (**Tableau 4**).

Récemment, un MV codant pour le GM-CSF (Granulocyte - Macrophage Colony Stimulating Factor), une cytokine qui favorise l'accumulation et la maturation des cellules dendritiques a montré une efficacité thérapeutique supérieure au virus MV seul dans un modèle murin immunocompétent de cancer colorectal[180]. Cette efficacité améliorée a été mise en évidence par la présence de cellules immunitaires effectrices anti-tumorales dans la rate des souris et par une infiltration des tumeurs sous-cutanées par des lymphocytes T spécifiques d'antigènes tumoraux suite à l'injection intra-tumorale du MV-GM-CSF. Dans cette étude, plus d'un tiers des souris traitées par le MV-GM-CSF ont présenté une régression complète de la tumeur et ont rejeté des greffes de tumeurs ultérieures, ce qui suggère l'établissement d'une réponse immunitaire anti-tumorale protectrice à long terme.

Dans une autre étude, les séquences codant pour une petite protéine NAP (Neutrophil-Activating Protein) ont été insérées dans le génome du MV. Cette protéine, dérivée d'*Helicobacter pylori* et agoniste du Toll-Like Receptor 2 (TLR2), a ainsi montré

une efficacité thérapeutique supérieure en comparaison avec la souche vaccinale du MV dans un modèle préclinique de cancer du sein[181]. Cette efficacité accrue est due aux propriétés immuno-adjuvantes de la protéine NAP, permettant le doublement de la médiane de survie des animaux traités. En effet, les cellules tumorales infectées sécrètent en grande quantité de cette protéine, ce qui induit l'expression des cytokines Tumor-Necrosis Factor- α (TNF- α), IL-6 (Interleukine-6) et IL-12 et permet ainsi l'induction d'une inflammation ainsi que la polarisation de la réponse immunitaire vers un profil Th1 favorable au développement d'une réponse immunitaire cellulaire anti-tumorale.

De plus, Li et ses collègues ont démontré que l'insertion du gène codant pour l'IFN- β murin dans le génome du MV permet d'augmenter ses propriétés immunostimulatrices. Ce MV codant pour l'IFN- β murin présente une meilleure capacité à détruire les cellules tumorales de mésothéliome, établies en xéno greffes sous-cutanées sur des souris immuno-déficientes, et a ainsi permis d'augmenter la survie des souris traitées en comparaison avec le MV seul[179]. Ce MV-IFN- β a notamment permis de modifier favorablement le microenvironnement tumoral par l'infiltration de la tumeur par des cellules immunitaires CD68+. En effet, les IFN de type I tel que l'IFN- β sont connus pour avoir des propriétés immunostimulatrices en participant à l'activation de différents types de cellules immunitaires tels que les lymphocytes T et lymphocytes Natural Killer (NK)[182], favorisant ainsi la réponse immunitaire anti-tumorale.

Un autre MV recombinant a récemment été modifié pour exprimer des anticorps contre les récepteurs CTLA-4 (MV-CTLA-4) et PD-L1 (MV-PD-L1) (**Figure 8**). Les molécules CTLA-4 et PD-L1 interviennent comme points de contrôle immunitaires et jouent un rôle critique dans l'inhibition des cellules T permettant aux cellules tumorales d'échapper à l'immunité cellulaire, en particulier contre les lymphocytes T spécifiques des antigènes tumoraux. Dans un modèle syngénique de mélanome, le traitement avec MV-CTLA-4 et MV-PD-L1 a ainsi retardé la progression tumorale [183]. De plus, les animaux traités avec MV-PD-L1 ont montré une prolongation significative de la survie globale. Le traitement avec ces deux virus a été associé à une augmentation significative des lymphocytes T CD3+ dans la tumeur et une diminution des cellules T régulatrices FoxP3+. Des régressions de xéno greffes tumorales humaines ont été observées dans toutes les souris traitées, avec une disparition complète de la tumeur pour 80% des animaux.

L'ensemble de ces résultats montrent que l'association du potentiel oncolytique du MV avec l'immunothérapie semblent être prometteuse.

d) Amélioration du tropisme du MV

Un virus oncolytique se réplique et tue sélectivement les cellules tumorales sans nuire aux cellules saines[184]. Afin d'améliorer ce ciblage, plusieurs virus MV recombinants ont été développés pour cibler des récepteurs spécifiques surexprimés sur les cellules tumorales (**Tableau 4**). En effet, même si l'entrée du virus dans les cellules tumorales grâce à la liaison de sa protéine virale H avec les récepteurs cellulaires CD46 et Nectin-4 surexprimés par de nombreuses tumeurs est primordiale dans la sélectivité tumorale du virus atténué de la rougeole, il serait cependant intéressant d'augmenter la spécificité de ce virus afin de limiter l'infection des tissus sains, renforçant ainsi sa sécurité d'utilisation chez l'homme. Cela permettrait aussi de pallier à la variabilité d'expression de ses récepteurs entre les patients atteints d'un même cancer.

Ainsi, des modifications de la protéine H peuvent améliorer cette spécificité de liaison du virus en la redirigeant vers un marqueur membranaire exprimé à la surface des cellules tumorales. Le fait que la liaison au récepteur et la fusion membranaire sont médiées par deux protéines différentes, respectivement la protéine d'attachement (l'hémagglutinine) et la protéine de fusion, facilite la stratégie de modification du virus de la rougeole. Ainsi, avec l'ajout de domaines de spécificité, tels que des anticorps à chaîne unique (scFv, single-chain fragment variable), à l'extrémité carboxyle de la protéine d'attachement, les souches vaccinales du virus de la rougeole MV acquièrent un tropisme restreint aux cellules exprimant les récepteurs désignés. Ces récepteurs seront reconnus par la chaîne d'anticorps greffée à l'extrémité de l'hémagglutinine. La fusion membranaire est obtenue par la protéine de fusion non modifiée ce qui n'a pas d'impact négatif sur la formation des syncytia.

Les souches vaccinales du virus de la rougeole recombinantes qui expriment une hémagglutinine reciblée à la place de l'hémagglutinine standard sont générées de manière fiable et sont stables [185]. En outre, ces souches virales perdent leur capacité à infecter les cellules par les récepteurs classiques (CD46 et Nectin-4), ceci par des mutations de résidus protéiques spécifiques qui sont nécessaires pour la liaison [186]. Ainsi, plusieurs virus recombinants ont été générés, possédant une protéine H modifiée fusionnée à un fragment scFv dirigées soit contre le récepteur PSCA (prostate stem cell antigen) exprimé sur les

cellules cancéreuses prostatiques et pancréatiques [187], contre le récepteur CD20 spécifique des lymphomes B Non-Hodgkiniens [170], contre l'antigène carcino-embryonnaire (CEA) exprimé sur les cellules cancéreuses coliques [181], contre le récepteur de l'interleukine-13 surexprimé sur les cellules de gliome [182], [183], ou encore contre le prostate-specific membrane antigen (PSMA) surexprimé sur les cellules prostatiques [184]. Ces virus ont démontré un ciblage efficace des cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* dans des modèles murins.

Ces stratégies de redirection de la liaison virale permettent aussi d'augmenter la sécurité du traitement. Dans un modèle de souris transgénique exprimant le récepteur CD46, un traitement par injection intra-cérébrale du virus sans mutation de H entraîne une neurotoxicité majeure. En revanche, les animaux traités avec le virus exprimant l'interleukine-13 à l'extrémité C-terminale de la protéine H n'ont présenté aucun de signe de toxicité [188]. Il faut noter que le virus utilise des récepteurs humains, ce qui rend difficile les études de toxicité du virus chez l'animal. En effet, outre la création de souris transgéniques exprimant le récepteur CD46 humain, la réponse immunitaire innée de la souris empêche l'infection, d'où l'utilisation de souris incapables de répondre à l'interféron (souris sans le récepteur à l'interféron IFNAR).

D'autres stratégies de redirection du tropisme du virus oncolytique de la rougeole MV ont été développées récemment par Friedrich et ses collègues et ont permis d'obtenir un MV recombinant capable de reconnaître deux marqueurs tumoraux simultanément, Her2/neu (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2) et une molécule d'adhésion des cellules épithéliales EpCam (Epithelial cell adhesion molecule) [189]. Cette stratégie consiste en l'ajout, à l'extrémité de l'hémagglutinine virale, d'un motif répété de la protéine Ankyrine (Designed Ankyrin Repeat Protein - DARPins). Ces domaines Ankyrines sont des motifs protéiques impliqués dans la régulation des interactions protéine-protéine. Les séquences codant pour DARPins spécifiques de marqueurs tumoraux sont insérées dans le génome du MV afin de créer une protéine de fusion H-DARPin. Dans un modèle murin de xénogreffes de cellules tumorales humaines, ce virus modifié a permis d'éliminer efficacement les tumeurs de ces animaux. Avec cette redirection de la liaison virale, les auteurs ont souligné l'intérêt d'utiliser ce virus bispécifique, permettant d'éviter les phénomènes de sélection de variant tumoraux qui n'expriment pas les récepteurs classiques du virus et le ciblage du

marqueur EpCAM associé aux cellules tumorales souches. Les auteurs espèrent pouvoir s'attaquer ainsi directement aux cellules qui initient la tumeur.

Une autre approche pour restreindre la réplication du virus MV au tissu tumoral a été décrite dans un modèle de glioblastome, en exploitant l'expression tissu-spécifique de certains microARN (miR). Les miR sont des ARN simple brin courts propres aux cellules eucaryotes qui interviennent dans la régulation post-transcriptionnelle afin d'inhiber l'expression d'un gène. Ils s'apparient à la séquence complémentaire de l'ARN messager du gène cible et conduisent à la répression transcriptionnelle ou à sa dégradation [190]. Les travaux menés depuis plusieurs années ont décrit la dérégulation des miR dans différents types de cancers permettant de distinguer les tissus sains des tissus tumoraux et de différencier les types de cancers selon le profil d'expression des miR [191], [192]. L'expression différentielle des miR est une caractéristique du tissu tumoral qui a été exploitée pour les virus oncolytiques afin de restreindre leur réplication au tissu tumoral[193]. Ainsi, il a été démontré que l'ARN interférent microRNA-7 est régulé négativement dans les cellules de gliome, parce qu'il est impliqué dans la répression de l'expression du récepteur à l'Epidermal Growth Factor (EGF-R) [194], alors qu'il est abondant dans le tissu neural sain[195]. De ce fait, un virus MV sensible au miR-7 a été généré contenant des séquences cibles du miR-7 au niveau de la région 3' non transcrite du gène codant pour la protéine F. La présence de miR-7 dans le tissu sain inhibe effectivement la traduction des protéines virales et bloque la propagation du virus. L'effet du virus est très atténué dans les cellules normales mais il se réplique dans le tissu neural néoplasique [195]. Dans un modèle préclinique de xénogreffe de glioblastome multiforme humain chez la souris, ce virus a démontré son efficacité sans entraîner de neurotoxicité après une injection intracrânienne [195].

e) Amélioration de la traçabilité

Dans le but d'évaluer l'efficacité thérapeutique du virus oncolytique de la rougeole, il est nécessaire de suivre par des méthodes non invasives la réplication du virus, la spécificité de l'infection, la localisation de l'infection et son étendue. Dans cette optique, le virus de la rougeole peut être modifié pour visualiser et quantifier la réplication du virus *in vivo*. Ainsi, deux virus recombinant, MV-GFP et MV-CEA, qui codent respectivement pour la protéine fluorescente verte (GFP) et l'antigène carcinoembryonnaire (CEA), ont été développés (**Figure 8**). Le virus MV-GFP est couramment utilisé dans l'évaluation *in vitro*

lorsqu'on utilise des techniques de microscopie par fluorescence pour suivre la réplication virale, tandis que le MV-CEA est utilisé en tant que marqueur biologique de l'infection *in vivo*. Il permet un suivi quantitatif de l'expression des gènes viraux par série de mesures dans le sang périphérique des patients. Le potentiel thérapeutique du MV-CEA a déjà été démontré dans plusieurs modèles précliniques [196]–[198] et est actuellement évalué dans un essai clinique de phase I pour le traitement du cancer de l'ovaire récurrent et le glioblastome [199]. Cependant, l'expression de CEA ne permet pas de déterminer si le virus s'est répliqué dans une cellule tumorale ou dans une cellule saine.

Enfin, il existe une autre stratégie intéressante utilisant un virus de la rougeole exprimant le NIS [156]. L'infection des cellules tumorales par le MV-NIS permet de visualiser la dispersion des cellules infectées au sein de la tumeur grâce à la technique "single-photon emission computed tomography " SPECT ou de la tomographie par émission de positons (TEP) [200]. Ces techniques permettent de détecter *in vivo* la réplication virale au sein de la tumeur.

	Souche virale	Modifications génétiques	Types de cancers
Souche vaccinale atténuée	MV-Edm	Non modifié	Leucémie [201], lymphome [202], myélome multiple [203], cancer de l'ovaire [204], mélanome [205]
Amélioration du tropisme	MV-CD20	Reciblage contre CD20	Leucémie, fibrosarcome [206]
	MV-CD38	Reciblage contre CD38	Erythroleucémie, lymphome de Burkitt, cancer de l'ovaire, glioblastome [207]
	MV-HER2/neu	Reciblage contre her2/neu	Cancer de l'ovaire, médulloblastome [208]
	MV-EGFRvIII	Reciblage contre EGFR	Erythroleucémie, lymphome de Burkitt's cancer de l'ovaire, Glioblastome [209]
	MV-PSMA	Reciblage contre PSMA	Cancer de prostate [210]
	MV-CD133	Reciblage contre CD133	Carcinome hépatocellulaire, cancer du côlon, gliome [211]
	MV- α V β 3-integrin	Reciblage contre α V β 3-integrin	Myélome multiple [212]
	MV-MMP	Reciblage contre métalloprotéinases MMP	Carcinome hépatocellulaire, fibrosarcome, cancer des voies biliaires [213], [214]
	MV-miRNA	Reciblage contre des séquences miRNA	Glioblastome [195]
	MV-DARPs	Reciblage contre EGFR, Her2/neu et EpCAM	Adénocarcinome du côlon, fibrosarcome, carcinome ovarien, glioblastome [189]
Amélioration de la traçabilité	MV-CEA	Gène rapporteur CEA	Cancer ovarien [177], [199], glioblastome [158], cancer du sein [160], carcinome

	MV-NIS	Gène rapporteur NIS	hépatocellulaire [215], cancer de la prostate [197] Cancer ovarien [177], [199], myélome multiple[216], glioblastome [198], carcinome hépatocellulaire[215], cancer du pancréas [217], cancer de la prostate [197], carcinome de la tête et du cou, carcinome thyroïdien, carcinome hypopharyngéal [218], cancer colorectal [219], cancer de l'endomètre [220], lymphome à cellules T [221]
Gènes Suicides	MV-PNP	Enzymes « Prodrug convertase »	Leucémie/lymphome [222], cancer colorectal [187], cancer du pancréas [223]
	MV-SCD/FCU1	Enzymes « Prodrug convertase »	Cancer ovarien [224], mélanome [225], carcinome des voies biliaires [226], carcinome hépatocellulaire [172] carcinome colorectal [227]
Gènes Immuno-stimulateurs	MV-GMCSF	Gène du GM-CSF	Lymphome de Burkitt [180]
	MV-NAP	Gène de la « Neutrophil activating protein »	Cancer du sein [228]
	MV- α CTLA4	Anticorps anti-CTLA-4	Mélanome malin [183]
	MV- α PDL-1	Anticorps anti-PDL-1	Mélanome malin [183]
	MV-Hblind-IL13	Recyclage contre IL-13	Glioblastome[229]
	MV-IFN	IFN- β	Mésothéliome [179]

Tableau 4. Les modifications génétiques de la souche MV-Edmonston.

(adapté d'après Aref et al., 2016 [134]).

4. Essais cliniques

Les premières observations suggérant que le virus sauvage de la rougeole possède des propriétés oncolytiques contre les tumeurs hématologiques, ont été publiés en 1971. Des régressions spontanées de lymphome d'Hodgkin [230], [231] et de lymphome de Burkitt [232], [233] ont été observées suite à l'infection naturelle par la souche sauvage de virus de la rougeole. Ces propriétés oncolytique contre les tumeurs hématologiques sont probablement dus à son tropisme dirigé contre la molécule CD150.

Depuis ce temps, l'activité oncolytique des souches atténuées de la rougeole a été étudiée dans plusieurs modèles pré-cliniques *in vitro* et *in vivo* sur des souris immunodéficientes. Cependant, les difficultés à développer des modèles animaux pour un

virus ou l'homme est son seul hôte naturel, et notre compréhension relativement limitée du mécanisme avec lequel le virus de la rougeole exerce son activité oncolytique, ont sans doute contribué à la lenteur du développement clinique de cette approche.

Aujourd'hui, avec les avancées récentes dans le domaine de la virothérapie antitumorale, l'utilisation du virus atténué de la rougeole n'est plus un exercice purement académique, plusieurs essais cliniques sont en cours (**Tableau 5**).

Souche virale	Voie	Titre viral, durée	Pathologie	Phase clinique et nombre de patients (n)	Résultats cliniques	Année	Référence
MV-EZ	Intra-tumorale	10 ² -10 ³ TCID ₅₀	Lymphome cutané à cellules T	Phase 1 (n = 5)	-Régression complète des lésions injectées : 1 patiente sur 5 -Régression partielle des lésions injectées : 3 patientes sur 5 -Régression partielle des lésions distantes : 2 patientes sur 5	2005	[202]
MV-CEA	Intra-péritonéale	10 ³ -10 ⁹ TCID ₅₀ (toutes les 4 semaines pendant 6 mois)	Cancer de l'ovaire	Phase 1 (n = 21)	Médiane de survie d'un an chez 14 des 21 patientes.	2010	[199]
MV-NIS	Intra-péritonéale	10 ⁸ -10 ⁹ TCID ₅₀ (toutes les 4 semaines pendant 6 mois)	Cancer de l'ovaire	Phase 1 (n=16)	Médiane de survie de 26,5 mois	2015	[234]
MV-NIS	Intra-veineuse	10 ⁶ -10 ¹¹ TCID ₅₀	Myélome Multiple	Phase 1 Phase 2 en cours	Rémission complète chez une des 2 patientes injectées.	2014	[235]

Tableau 5. Essais cliniques utilisant le virus de la rougeole.

EZ, Edmonston-Zagreb; CEA, carcinoembryonic antigen; NIS, thyroïdal sodium iodide symporter; TCID₅₀, 50% tissue culture infectious dose (adapté d'après Matveeva et al., 2015 [236]).

a) Essai clinique de phase I : Lymphome cutané à cellules T

Le premier essai clinique de phase I a été réalisé par Heinzerling et ses collègues. Ils ont évalué l'efficacité oncolytique de la souche atténuée du virus de la rougeole Edmonston-Zagreb sur cinq patients atteints de Lymphome Cutané à Cellules T (Cutaneous T-Cell Lymphoma - CTCL) [202]. Dans cette étude clinique, les résultats ont démontré que l'injection intra-tumorale de MV provoque une infection locale des cellules tumorales, mise en évidence par l'effet cytopathique caractéristique du virus et qui n'a pas été abrogée par la présence d'une pré-immunité contre la rougeole. Des régressions tumorales ont été observées pour trois patients. De manière intéressante, des régressions de tumeurs distantes non injectées ont été aussi enregistrées. Ces résultats ont été obtenus avec de faibles doses de virus associées à un traitement par interféron (IFN- α) visant à limiter la propagation virale. L'IFN- α a permis d'atténuer la virulence du MV dans les cellules saines, normalement sensibles à l'action antivirale de l'IFN- α , tandis que les cellules tumorales qui avaient perdu cette sensibilité ont été efficacement infectées. Bien que le faible effectif de patients et/ou le traitement par interféron aient pu influencer les résultats, cette étude a suscité un grand intérêt pour le potentiel oncolytique du MV.

b) Essai clinique de phase I : Cancer ovarien chimio-résistant

Plus récemment, Evanthia Galanis et ses collègues (Mayo Clinic, Rochester, MN, USA) ont utilisé la souche Edmonston recombinante pour le CEA soluble (MV-CEA) et pour le symporteur Iode/sodium (MV-NIS). Le MV-CEA permet le suivi de la réplication virale par dosage sérique du CEA [199], alors que le MV-NIS permet de suivre la réplication du virus par imagerie SPECT-CT suivant l'injection d' ^{123}I [234]. Une étude de phase I incluant 21 patientes, sélectionnées pour être immunisées contre le virus de la rougeole, présentant un cancer de l'ovaire en progression et en échec thérapeutique après chimiothérapie par l'association de paclitaxel et de sels de platine, a été menée.

Pour le MV-CEA, des doses croissantes de virus, allant de 10^3 TCID₅₀ (0,1 fois la dose vaccinale de l'enfant) à 10^9 TCID₅₀ (100 000 fois la dose vaccinale de l'enfant), ont été injectées dans la cavité péritonéale des patientes. Le traitement est répété tous les mois et les patientes ont reçu jusqu'à 6 cycles de traitement. Une élévation de la concentration de CEA a été mesurée dans le sang chez les trois patientes traitées avec les plus fortes doses. Aucune toxicité limitante n'a été observée. Le MV-CEA a permis une stabilisation de la maladie, avec une réponse clinique objective, pour 14 des 21 patientes incluses dans l'essai. Un

doublément de la médiane de survie (12,15 mois) par rapport à la moyenne de survie attendue dans cette population de patientes (6 mois), et une stabilisation de la maladie d'une durée moyenne de 92,5 jours, ont été enregistrés. La réponse clinique dépend de la dose injectée : la médiane de survie est de 10,6 mois pour les faibles doses (10^3 - 10^7 TCID₅₀) et passe à 38,4 mois pour les fortes doses (10^8 - 10^9 TCID₅₀). Les effets secondaires enregistrés ont été de faible grade, incluant la fièvre, la fatigue et des douleurs abdominales. Dans cette étude, plusieurs observations intéressantes sont à noter: (i) les titres d'anticorps anti-MV dans le sang et dans le liquide péritonéal sont restés à un niveau constant suite à l'injection répétée du virus ; (ii) Aucune preuve d'immunosuppression induite par le traitement par le MV-CEA n'a été observée ; (iii) Il n'y a eu aucune preuve d'excrétion du virus dans la bouche ou les urines des patientes[199].

Pour le MV-NIS, le virus a été injecté à 16 patientes atteintes de cancer ovarien et ayant échoué à quatre lignes de chimiothérapies[234]. Seules les fortes doses ont été testées suite aux résultats obtenus avec le MV-CEA et aucune toxicité limitante n'a été observée avec la dose maximale de 10^9 TCID₅₀. L'injection par voie intrapéritonéale du MV-NIS a permis la stabilisation de la maladie chez 13 patientes sur les 16 traitées, avec une médiane de survie de 26,5 mois. Dans cette étude, il a été montré que le traitement avec ce virus active une réponse immunitaire anti-tumorale caractérisée par la présence de lymphocytes T spécifiques d'antigènes de tumeur IGFBP2 et FR α dans le sang.

Ces données cliniques soulignent la bonne tolérance du traitement et encouragent la poursuite des recherches sur l'utilisation du virus de la rougeole. Un essai de phase II randomisé est en cours de recrutement [237], dans le but de comparer l'administration intrapéritonéale du MV-NIS à un traitement chimiothérapeutique.

c) Essai clinique de phase I : Myélome

Un essai clinique de phase I a été réalisé par l'équipe de Stephen Russell à la Mayo Clinic (Rochester, MN, USA) pour évaluer l'efficacité du MV-NIS chez des patientes atteintes de myélome multiple disséminé. Ce cancer affecte les cellules plasmiques de la moelle osseuse et est réfractaire aux traitements conventionnels. Chaque patiente a reçu une injection intraveineuse unique d'une forte dose de MV-NIS, 10^{11} TCID₅₀. L'infection spécifique des plasmocytomes disséminés a été suivie grâce au MV-NIS. Des résultats préliminaires concernant deux patientes traitées ont été publiés en 2014 [235]. L'injection

intraveineuse unique du MV-NIS a entraîné une rémission complète de la maladie ayant duré 9 mois pour la patiente 1 au moment de la publication. Chez cette patiente, un plasmocytome palpable au niveau du front a commencé à diminuer 36 heures après l'injection du MV-NIS et n'était plus palpable 6 semaines plus tard. Cette patiente était toujours en vie 24 mois après le traitement. Les résultats sont cependant moins favorables pour une deuxième patiente ayant bénéficié du même traitement, malgré une rémission de la maladie 6 semaines après l'injection du MV-NIS. Des plasmocytomes en progression ont été détectés et la progression du cancer a été observée. Il faut noter que dans cette étude, les deux patientes étaient non immunisées contre le virus de la rougeole. Cette étude est la première à rapporter un cas de rémission complète après traitement avec le MV-NIS. Un essai clinique de phase II est en cours de recrutement par la même équipe[238] pour évaluer le MV-NIS avec ou sans cyclophosphamide, un agent immunosuppresseur déjà utilisé dans le traitement du myélome multiple réfractaire.

d) Essais cliniques en cours

Trois essais cliniques de phase I sont en cours à la Mayo Clinic, visant à évaluer l'efficacité de la virothérapie anti-tumorale utilisant le virus de la rougeole. Ces essais recrutent des patients atteints de carcinomes squameux récurrents ou métastatiques de la tête et du cou[239], de mésothéliome pleural malin[240] et de glioblastome multiforme récurrent [241].

5. Considérations cliniques pour l'utilisation du virus de la rougeole

Le système immunitaire peut participer à l'effet anti-tumoral du MV en permettant la présentation d'antigènes et l'activation des cellules effectrices spécifiques des cellules tumorales. Il peut cependant aussi avoir une action antivirale et limiter l'impact du traitement. Ainsi, l'immunisation contre le MV après une infection par le virus sauvage, après vaccination, ou par des injections répétées du virus dans un protocole thérapeutique pourrait être un inconvénient pour l'utilisation du MV en tant qu'agent oncolytique.

Du point de vue de la sécurité, la présence d'anticorps anti-MV pourrait être un avantage. Du point de vue de l'efficacité oncolytique, les anticorps neutralisants pourraient par contre être un facteur limitant[242], [243]. En effet, l'administration systémique du virus de la rougeole via le système vasculaire lui donne théoriquement accès à toutes les régions perfusées des tumeurs primaires et métastatiques, ce qui en fait la voie d'administration

préférentielle pour le traitement de maladies métastatiques. Cependant, la voie systémique rend également l'utilisation du virus de la rougeole compliquée par les anticorps anti-MV neutralisants préexistants, car la majorité des patients pourraient avoir été exposés ou vaccinés contre la rougeole, ce qui pourrait entraîner une élimination rapide du virus. Il a notamment été décrit que les titres de ces anticorps augmentaient progressivement à chaque nouvelle exposition au virus, ce qui pourrait diminuer considérablement son potentiel thérapeutique [244].

a) L'immunité humorale

Dans les modèles précliniques, des souris SCID portant des xénogreffes de myélome multiple traitées avec MV-NIS ont montré un taux de survie inférieur après immunisation passive avec un anticorps anti-MV par rapport aux animaux non immunisés (50 jours contre 72 jours; $p < 0,0001$) [216]. Chez des souris athymiques portant des xénogreffes de tumeur ovarienne, une augmentation significative de la survie a été observée suite à l'injection du MV-NIS dans des souris non immunisées contre la rougeole par rapport à des souris immunisées ($P < 0,0001$) [245]. Cependant, dans l'essai clinique effectué par l'équipe d'Evanthia Galanis, chez des patientes atteintes de cancer ovarien, une réponse clinique objective a été observée et ce dans le contexte d'une immunité antivirale préexistante [234].

b) Le système réticulo-endothélial

Le système réticulo-endothélial peut limiter l'efficacité des virus oncolytiques administrés par voie systémique en réduisant la demi-vie circulatoire ($t / 2$) et la biodisponibilité du virus. Une publication récente montre que le virus MV injecté par voie intraveineuse est séquestré par le système phagocytaire mononucléaire (MPS) du foie et de la rate à la fois chez des souris immunocompétentes transgéniques exprimant le récepteur CD46 et des souris immunodéficientes n'exprimant pas le CD46. L'élimination du virus de la circulation sanguine est rapide, avec une demi-vie de seulement une minute [246]. Malgré cela, les obstacles posés par le système réticulo-endothélial sont surmontés lorsque le virus est administré à forte dose [247].

c) Surmonter l'immunité antivirale contre le MV

i. Immunosuppression

Cette stratégie consiste à associer le traitement viral à un traitement immunosuppresseur qui permet d'inhiber transitoirement le système immunitaire permettant

au virus d'atteindre la tumeur sans être neutralisé. Le système immunitaire peut ensuite être restimulé pour participer à l'effet thérapeutique. Ceci maximiserait à la fois la propagation virale et l'immunité anti-tumorale[248]. Dans un modèle murin d'adénocarcinome colique, l'association de cyclophosphamide et du virus de la rougeole armé d'un gène suicide a permis de retarder l'apparition d'anticorps neutralisants anti-MV et d'augmenter la réponse anti-tumorale jusqu'à l'obtention de 90 % de réponse complète[223]. Cette stratégie combinant le virus de la rougeole et la cyclophosphamide a aussi été évaluée dans une étude préclinique sur le myélome[178].

ii. Utilisation des transporteurs cellulaires

Des stratégies ont également été développées afin de protéger les virus oncolytiques des anticorps neutralisants en utilisant des transporteurs cellulaires tels que des cellules souches mésenchymateuses. Le but de cette stratégie est de délivrer le virus jusqu'à la tumeur afin d'éviter sa neutralisation par le système immunitaire. Cette approche est développée pour plusieurs virus oncolytiques tels que le virus de la vaccine, les adénovirus, le VSV et le virus de la rougeole[245], [249]. Les transporteurs sont ainsi infectés *ex vivo*, puis transférés à l'hôte pour atteindre les sites tumoraux.

Des monocytes infectés par le virus de la rougeole peuvent délivrer le virus dans les cellules tumorales par hétérofusion. Dans un modèle murin de carcinome hépatocellulaire disséminé, des animaux ont été immunisés passivement par injection d'anticorps neutralisants anti-MV avant traitement. Dans ce modèle, des injections intrapéritonéales du MV n'avaient pas d'effet sur la régression tumorale ou la survie des animaux. En revanche, quand le virus a été préalablement introduit dans des monocytes (U-9370), il a été démontré une meilleure efficacité d'infection, même en présence d'anticorps neutralisants [250]. Un autre modèle de tumeur ovarienne a été établi chez des souris athymiques mais passivement immunisées contre le virus de la rougeole. Contrairement au traitement par le virus MV seul ou avec des cellules souches mésenchymateuses seules, l'injection de cellules souches mésenchymateuses infectées par le virus a augmenté la survie des souris et a permis de protéger l'activité oncolytique du virus MV de la neutralisation par les anticorps anti-MV [245].

Conclusion

La virothérapie antitumorale apparaît comme une nouvelle modalité thérapeutique pertinente pour les patients atteints de cancer. En effet, les autorisations de la FDA et de l'Union Européenne concernant l'utilisation du T-Vec, mais aussi l'évaluation de plusieurs virus oncolytiques dans des phases avancées d'essais cliniques, prouvent que cette nouvelle stratégie est très prometteuse et pourrait avoir un impact significatif sur la survie et la qualité de vie des patients atteints de cancers.

L'arsenal des virus oncolytiques disponibles n'a cessé d'augmenter ces dernières années. Le virus atténué de la rougeole est un candidat intéressant pour une utilisation thérapeutique. En effet, l'excellent profil de sécurité des souches vaccinales du MV rend favorable son transfert vers la clinique par rapport à d'autres virus oncolytiques.

Contrairement au génome des virus à ADN tel que les adénovirus (Adv) et l'herpès simplex virus (HSV), le virus MV avec son génome à ARN se réplique dans le cytoplasme des cellules infectées. De plus, ce virus peut contenir des transgènes de grande taille tout en gardant sa stabilité *in vitro* et *in vivo*, offrant ainsi de larges possibilités de modifications [207]. C'est ainsi que de nombreux MV recombinants ont pu être créés, permettant l'amélioration de l'efficacité lytique et le suivi de la réplication.

Les souches vaccinales du MV présentent l'avantage de cibler spécifiquement et de lyser efficacement les cellules tumorales, profitant de certaines aberrations apparues au cours du processus de tumorigenèse, notamment la surexpression des récepteurs spécifiques au MV et certains défauts dans la réponse antivirale IFN de type I. Les tissus sains sont, de ce fait, épargnés de l'effet cytotoxique du MV. Au contraire, les adénovirus, les herpèsvirus ou le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) ont été génétiquement modifiés avec des mutations ou des délétions dans les gènes nécessaires à la réplication. De plus, la capacité du MV à propager l'infection par fusion cellulaire, entraînant la formation d'agrégats multicellulaires appelés syncytia, fournit un mécanisme supplémentaire d'oncolyse que de nombreux autres virus oncolytiques ne possèdent pas.

Il a aussi été démontré que plusieurs virus oncolytiques, parmi lesquels le MV, ont la capacité d'activer le système immunitaire et d'entraîner l'établissement de réponses anti-tumorales spécifiques qui pourraient jouer un rôle important dans l'éradication des tumeurs primaires et des métastases.

L'ensemble de ces caractéristiques fait des souches vaccinales du MV des virus oncolytiques prometteurs qui n'ont été testés au cours de premières phases d'essais cliniques contre différents cancers. Les résultats récents obtenus avec ce virus sont extrêmement encourageants du point de vue thérapeutique même pour des cancers multi-résistants disséminés [235].

PARTIE IV. La réponse interféron de type I

La réponse immunitaire de l'organisme face aux pathogènes, et notamment face aux infections virales, combine des réponses innées et adaptatives. L'immunité innée est la première ligne de protection contre les agents pathogènes, tandis que l'immunité adaptative permet la mise en place d'une mémoire immunitaire à long terme.

Parmi les mécanismes de l'immunité innée, la réponse interféron (IFN) de type I impliquant les IFN- α et $-\beta$ est une réponse essentielle pour lutter contre les infections, en particulier les infections virales. Les IFNs font partie de la famille des cytokines et ont été décrits en 1957 par Isaacs et Lindenmann pour leurs propriétés antivirales [251]. Ils ont mis en évidence que des cellules de poulet infectées par le virus de la grippe sécrétaient un facteur capable de protéger d'autres cellules vis-à-vis d'une infection par ce même virus ou par un autre virus. Cette substance qui permet d'induire un état antiviral dans les cellules et d'interférer avec la réplication virale a ainsi été appelée interféron.

Lors d'une infection virale par le virus de la rougeole, l'hôte déclenche une réponse immunitaire rapide dont les interférons de type I est la cytokine centrale. Différents travaux ont montré le rôle important de l'immunité innée, en particulier celui des interférons, dans la résistance de l'hôte à l'infection par MV et la limitation de la multiplication virale. Ainsi, des souris transgéniques CD46+ et dépourvues du récepteur aux interférons IFNAR, ne pouvant donc pas répondre à l'interféron endogène, deviennent plus sensibles à l'infection et développent une pathologie plus sévère [252].

La réponse IFN de type I se déroule en deux grandes parties. L'initiation de la réponse s'effectue par la détection d'un signal de danger qui va mettre en place la production d'IFN de type I. Ensuite, les IFN sécrétés se lient au récepteur IFNAR de manière autocrine ou paracrine, permettant l'établissement d'un état antiviral par l'expression de gènes ISG (Interferon-sensitive genes).

I. La détection des virus à ARN par la cellule hôte

La reconnaissance virale débute grâce à la détection des motifs viraux appelés PAMPs (pour pathogen associated molecular pattern). Il existe quatre classes de PAMP pour

les virus : l'ARN double brin (ARNdb), l'ARN simple brin (ARNsb), les motifs CpG de l'ADN et les protéines virales. Un virus peut toutefois aussi être détecté lors de son entrée dans la cellule ou lors des étapes plus tardives du cycle viral. Cette détection virale se fait grâce à une classe de protéines cellulaires appelée PRR (Pattern Recognition Receptors). Certains PRR sont localisés au niveau de la membrane plasmique de la cellule et détectent des pathogènes extracellulaires alors que d'autres se situent au niveau de la membrane des endosomes ou dans le cytoplasme et détectent des pathogènes intracellulaires. Les différents PRR se distinguent par les PAMP qu'ils reconnaissent et par le compartiment cellulaire dans lequel ils se trouvent.

Parmi les molécules les mieux caractérisées dans la détection de MV[253], on trouve les TLR (Toll-like receptors) et les hélicases RIG-I (Retinoic acid Inducible Gene I) et MDA5 regroupées sous le terme RIG-I-like receptors(RLR).

1. Senseurs des signaux de danger extérieurs : les TLRs

Les récepteurs TLR sont localisés au niveau de la membrane cellulaire ou dans les compartiments endosomaux, et leur expression est plutôt restreinte aux cellules immunitaires. Sur les 10 membres de la famille, TLR-2, 3, 4, 7 et 8 sont connus pour être impliqués dans la détection des virus à ARN. TLR-2, qui est notamment exprimé à la surface des macrophages et des DC et qui reconnaît les glycoprotéines virales, est notamment impliqué dans la reconnaissance de la glycoprotéine MV-H. La signalisation en aval de ce récepteur par l'intermédiaire de MyD88 conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN de type I[254]–[256].

TLR-7 et -8, présents dans le compartiment endosomal, sont également connus pour être impliqués dans la détection de l'ARN simple brin à partir de virions internalisés à l'intérieur des endosomes[257], [258]. Comme le MV pénètre dans la cellule par l'intermédiaire de la fusion membranaire directe plutôt que par l'utilisation des endosomes, cette voie est susceptible de jouer un rôle moins prédominant ici.

2. Senseurs des signaux de dangers cytoplasmiques: les RLR

La famille des RLR est composée de trois récepteurs : RIG-I (retinoic-acid-inducible gene 1 ou DDX58), MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5) et LGP2 (laboratory of genetics and physiology 2) [259]–[261]. Ces récepteurs, exprimés de façon

ubiquitaire, sont localisés dans le cytoplasme et reconnaissent des ARN viraux. Lors de la reconnaissance d'ARN, RIG-I et MDA5 activent la réponse immunitaire innée alors que LGP2 agit comme un modulateur de cette activation [262], [263].

Les trois RLR sont composés de deux (pour le LGP2) ou trois (pour RIG-I, MDA5) types de domaines ayant des fonctions complémentaires (**Figure 9**). MDA5 et RIG-I possèdent à l'extrémité N-terminale deux domaines de recrutement CARD (caspase activation and recruitment domains). Ces domaines sont essentiels pour l'expression de l'IFN- β [264]. Le domaine CARD de MDA5 et RIG-I interagit avec le domaine CARD de la molécule MAVS (mitochondrial antiviral signaling) située à la surface des mitochondries et des peroxysomes et est responsable de la transduction du signal [261], [265]–[267].

Le domaine C-terminal (CTD) est commun aux récepteurs RIG-I, MDA5 et LGP2. Les CTD de ces trois hélicases jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance des ARN. Entre les domaines CARD et le CTD se trouve le domaine DExH/D box RNA hélicase permettant de fixer l'ARN. Il possède aussi une activité enzymatique ATP-dépendante.

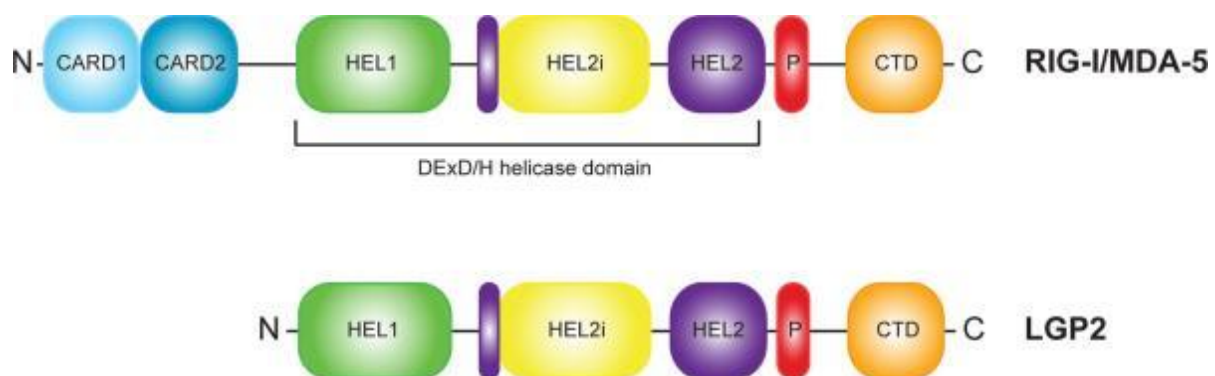


Figure 9. Structure des RLR.

RIG-I et MDA-5 ont une organisation de domaine similaire. Les domaines sont : CARD1 (bleu ciel), CARD2 (bleu), hélicase HEL1 (vert), hélicase HEL2i (jaune), hélicase HEL2 (Violet), régulateur P (rouge) et le domaine C-terminal CTD (Orange). LGP2 ne possède pas les domaines CARD N-terminaux [268].

RIG-I et MDA5 sont des hélicases dont le rôle est de distinguer les ARN cellulaires et des ARN viraux et de réguler ainsi le signal de transduction en aval. LGP2 joue au contraire un rôle de régulateur-inhibiteur de RIG-I et de MDA5. Malgré leurs similarités de

séquence et de structure, RIG-I et MDA5 reconnaissent des ARN distincts. Ainsi, RIG-I reconnaît préférentiellement des ARNdb courts (inférieurs à ~2 kb) et possédant une extrémité 5'ppp libre. Ce type d'ARN est normalement absent du cytosol de la cellule hôte, puisque les ARN cellulaires n'ont jamais d'extrémité 5'ppp libre, et signale donc leur origine virale[269], [270]. Ces ARN présente aussi une région en épingle à cheveux due à l'hybridation de séquences complémentaires présentes aux extrémités 5' et 3'. Cette structure est retrouvée dans le génome de nombreux virus à ARN simple brin négatif comme le virus de la grippe (Influenza A) et le virus de la rougeole [271], [272].

Les ligands de MDA5 sont moins bien caractérisés mais différentes études ont montré que MDA5 était activé par des ARNdb longs (supérieurs à ~2 kb) et de l'ARNdb synthétique non naturel tel que le poly(I:C) [273].

Par ailleurs, RIG-I et MDA5 n'auraient pas la même importance dans l'induction de la réponse IFN de type I. A l'origine, seule l'implication de RIG-I dans la reconnaissance des virus à ARN négatif avait été décrite. Des fibroblastes embryonnaires de souris n'exprimant pas RIG-I n'induisent pas de production d'IFN en réponse à des infections par le virus de la stomatite vésiculaire, le Sendai virus, le virus influenza A et le virus de la maladie de Newcastle. Au contraire, l'absence d'expression de MDA5 n'a aucun effet sur la réponse à ces infections [274]. Cependant, d'après une étude plus récente, des souris n'exprimant pas MDA5 présentent une augmentation de la morbidité et de la mortalité à la suite d'une infection par le virus Sendai. Ainsi, MDA5 joue aussi un rôle dans la détection des Paramyxoviridae. Récemment, des études ont d'ailleurs montré son implication dans l'activation de la voie IFN de type I lors de l'infection par le MV[275], [276].

II. Activation de la réponse IFN de type 1

L'activation des deux hélicases RIG-I et MDA5 permet leur liaison à la protéine adaptatrice MAVS (Mitochondrial Anti-Viral Signaling). La production d'IFN est négligeable dans des cellules dépourvues de cette protéine en réponse à une stimulation de MDA5 ou de RIG-I et, inversement, est activée après surexpression de MAVS[260]. La protéine MAVS contient un domaine CARD en N-terminal et un domaine transmembranaire en C-terminal permettant sa localisation dans la membrane mitochondriale. Une fois activés, RIG-I et MDA5, se lient à MAVS via une interaction CARD-CARD directe. L'activation de

MAVS permet le recrutement de plusieurs facteurs cytoplasmiques au niveau du complexe MAVS et induisent l'activation des kinases TBK1 (TANK-binding kinase) et IKK ϵ (I κ B kinase- ϵ), qui jouent un rôle essentiel dans l'activation des transactivateurs du gène de l'IFN- β : IRF-3/7 (IFN Regulatory Factor) et l'activation des kinases IKK α et IKK β responsables de l'activation de NF- κ B. La phosphorylation d'IRF3 et IRF7 entraîne une homodimérisation ou une hétérodimérisation de ces facteurs de transcription qui rejoignent alors le noyau pour constituer l'enhanceosome du gène de l'IFN- β [260], [277]. L'activation des facteurs de transcription IRF3, IRF7 et NF- κ B permet l'induction d'IFN- β et de cytokines pro-inflammatoires. Le facteur de transcription IRF3 est exprimé constitutivement dans les cellules, et reste dans un état latent. En revanche, l'IRF7 est présent dans le cytoplasme à un faible niveau mais est ensuite fortement exprimé pendant la phase tardive de la réponse IFN de type I en réponse à l'IFN- β . Cela permet la transcription des gènes codant pour les IFN- α et une amplification de la réponse anti-virale [278]. Chez l'homme, il existe un gène de l'IFN- β et 13 gènes de l'IFN- α (présentant 95% d'homologie entre eux). Au cours de cette phase, certains ISG (Interferon-Stimulated Gene) sont également exprimés, indépendamment de la liaison des IFN de type I sur leur récepteur. Leur expression est ensuite amplifiée par l'action des IFN- α/β . Ces ISG sont principalement ceux codant pour les IRF et les PRR, permettant une amplification rapide de la réponse antivirale [279] (**Figure 10**).

Une fois que les IFN de type I sont produits et sécrétés dans le milieu extracellulaire, ils se fixent sur leur récepteur IFNAR (IFN- α/β Receptor), hétérodimère composé des deux sous-unités IFNAR1 et 2 [279]. Ils vont agir de manières autocrine et paracrine. La liaison des IFN de type I à IFNAR, induit la phosphorylation des protéines STAT1 et STAT2 (Signal Transducer and Activator of Transcription) via les tyrosines kinases JAK1 (Janus Associated Kinase 1) et Tyk2 (Tyrosine Kinase 2), associées aux récepteurs IFNAR. STAT1 et STAT2 phosphorylés se dimérisent et s'associent à un troisième facteur, IRF9, pour constituer le complexe ternaire ISGF3 (*interferon-stimulated gene factor 3*). Ce complexe est ensuite relocalisé dans le noyau où il va se fixer sur des séquences de régulation ISRE (*IFN-stimulated response element*) et activer la transcription de plus d'une centaine de gènes appelés ISG (gènes stimulés par l'IFN) (**Figure 10**) [254].

Les ISG ont un rôle prépondérant dans l'immunité innée antivirale. Ils peuvent soit posséder une activité antivirale intrinsèque, soit participer eux mêmes à la signalisation IFN

(RLR, STAT1, IRF7) et produire ainsi une amplification de la réponse IFN. Les analyses transcriptionnelles ont permis d'identifier plus de 300 ISG et de les classer selon leur activité [280]. Les ISG agissent par différents mécanismes visant tous les stades du cycle viral depuis la pénétration, en passant par la transcription et la traduction jusqu'à l'assemblage final du virion. De ce fait, chaque étape du cycle de réplication virale représente une cible potentielle pour les ISG [279]. Les protéines Mx, PKR et OAS /RNase L font partie des ISG dont les propriétés antivirales ont été largement étudiées.

Les protéines Mx (Myxomavirus resistance), sont des dynamin-like GTPases (guanosine triphosphatases). Le génome humain code pour deux protéines Mx, MxA et MxB, qui sont induites par les IFN- α et- β . La protéine MxA possède une activité antivirale mais pas MxB. Les protéines MxA sont d'excellents marqueurs de l'induction d'une réponse anti-virale et sont les mieux caractérisées. En effet, leur expression dépend exclusivement de la signalisation IFN de type I ou type III [289]. La protéine MxA inhibe la multiplication de virus à ARN en favorisant la séquestration et la dégradation de composants viraux. Ainsi, il est reconnu pour différents virus que MxA exerce son activité antivirale en encerclant les nucléocapsides virales, les empêchant d'atteindre leur destination et d'exercer leur fonction. Il a été observé que la protéine MxA confère aux cellules une résistance contre le virus influenza, le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) et le virus de la rougeole[281]–[288]. Grâce à des transfections stables de MxA dans une lignée de glioblastome ou une lignée monocyttaire, il a été démontré que MxA inhibe la transcription du MV et interfère avec la synthèse des glycoprotéines virales [289], [290].

Un autre ISG très important dans les réponses antivirales est la PKR (ds RNA-dependent protein kinase). Cette protéine reconnaissant les ARNdb inhibe la traduction de tous les ARNm viraux et cellulaires via la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α [291]. De même, le complexe OAS/RNase L, activé par la reconnaissance des ARNdb, agit à la fois sur les composants cellulaires et viraux. Les protéines OAS activent la RNase L via la synthèse d'oligoadénylates liés en 2'-5' à partir d'ATP. L'enzyme ainsi activée dégrade alors les ARNs cellulaires et viraux [254]. Enfin, L'hélicase ADAR (adénosine désaminase ARN spécifique) catalyse la modification des adénosines des ARN en inosines par déamination. Ceci induit des modifications dans les ARN viraux (déstabilisation et mutations) qui conduisent à la synthèse de polypeptides

cellulaires et viraux aberrants [292]. Il a été démontré qu'ADAR-1 a un rôle dans la limitation de la réplication des virus à ARN comme le virus de la rougeole [293].

Malgré les études fonctionnelles réalisées ces dernières années, il existe un ensemble de protéines décrites pour leur capacité antivirale mais dont la fonction et le mode d'action reste encore à ce jour à déterminer et représente un des enjeux majeurs des recherches menées sur l'immunité innée [294], [295].

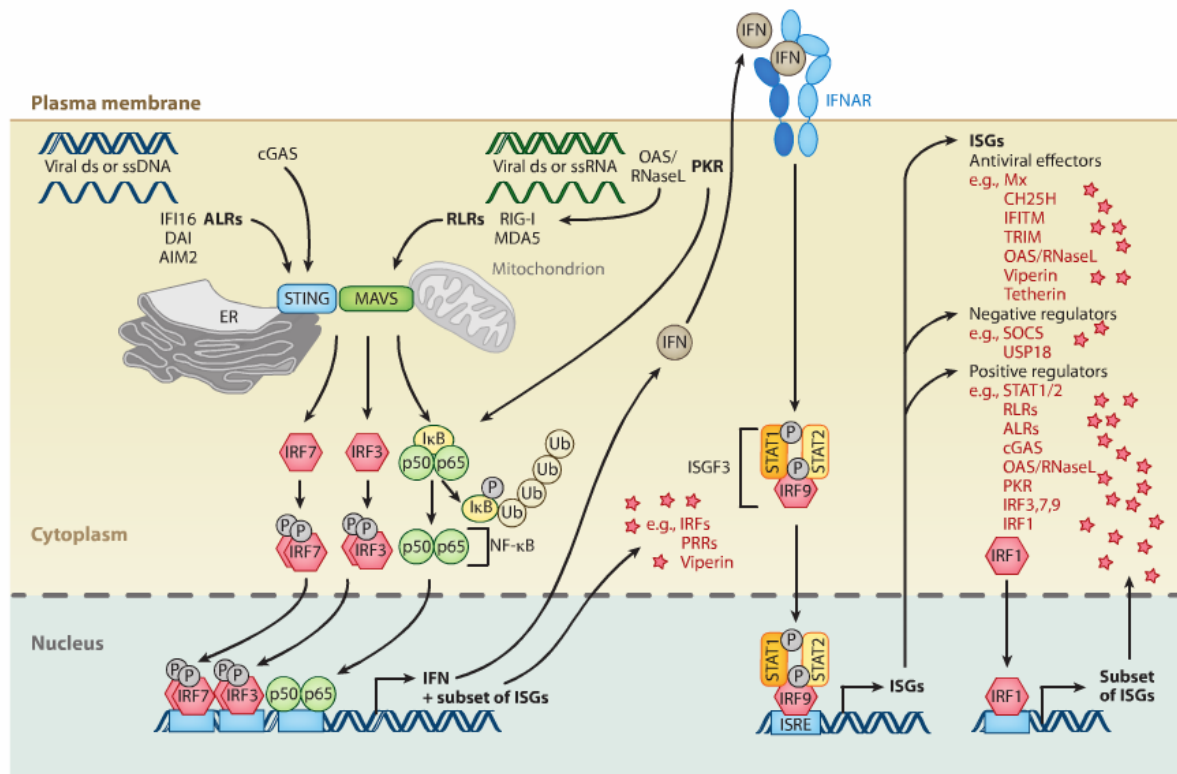


Figure 10. Activation de la réponse IFN type I sous les RLR et régulation cellulaire.

Après détection d'un ligand ARN, RIG-I et MDA5 activés se lient à MAVS via leurs domaines CARD. MAVS recrute alors plusieurs protéines (TRAF, TRADD, FADD,...) pour activer les facteurs de transcription NFκB, IRF-3 et IRF-7. Ceux-ci induisent ensuite l'expression du gène de l'IFN-β et un ensemble d'ISG. Ces ISG comprennent des IRF et des PRR, mais également des effecteurs antiviraux tels que la vipérine. L'IFN induit l'expression des gènes via la voie JAK-STAT, ce qui entraîne l'expression d'un large spectre d'ISG qui peuvent être divisés en effecteurs antiviraux et régulateurs négatifs ou positifs de la signalisation IFN [279]

III. Echappement du virus de la rougeole à la réponse interféron de type I

La détection des infections virales et le déclenchement de la réponse IFN de type I permettent la mise en place rapide dans les cellules d'un état antiviral efficace qui limite la

propagation du virus. Afin d'échapper à cette réponse cellulaire, les virus ont développé des stratégies plus ou moins complexes d'évasion. Plusieurs mécanismes sont mis en jeu afin de bloquer la voie IFN type I à la fois au niveau de son induction et de ses effecteurs.

Les protéines P, V et C du virus de la rougeole MV sont toutes impliquées dans la régulation négative des PRRs afin d'inhiber la synthèse des IFN. Ainsi, la protéine V du MV interagit directement avec le domaine hélicase de MDA5 et bloque la transduction du signal en inhibant son activité ATPasique [296]. Par ailleurs, le virus MV est capable d'inhiber la voie de signalisation induite par la liaison des IFN de type I sur leur récepteurs. En effet, les protéines C et V agissent à de multiples niveaux sur la fonction des protéines STAT : inhibition de la phosphorylation, dégradation, séquestration et blocage de la translocation nucléaire. Ainsi, la protéine V est capable de se lier à IRF9, affectant la formation du complexe ISGF3 indispensable à la transcription des ISG [297]. La protéine C est impliquée dans le blocage de la signalisation IFN de type I en s'associant au récepteur IFNAR ou en interférant avec la translocation nucléaire de STAT1 et STAT2 [298].

Les souches vaccinales atténuées du virus de la rougeole sont moins efficaces pour bloquer la réponse antivirale IFN de type I. Ceci est principalement dû à des mutations, apparues lors du processus d'atténuation, dans les différentes protéines virales, notamment la protéine V[165]. De plus, les souches vaccinales de MV sont également connues pour générer davantage de particules défectives interférentes qui peuvent activer la production d'IFN de type I suite à leur détection par RIG-I et Mda5 [299].

IV. Réponse interféron de type I et virothérapie

Outre leur action antivirale directe, les IFNs de type I et les ISG induits sont impliqués dans l'inhibition de la prolifération cellulaire et le contrôle de l'apoptose, ce qui permet la surveillance du processus cancéreux en activant la protéine pro-apoptotique p53 [87].

Au cours du processus de tumorigenèse, une cellule cancéreuse accumule de nombreuses modifications génétiques (acides nucléiques aberrants, fuite d'ADN dans le cytoplasme), ce qui active normalement la réponse IFN de type I et gêne la prolifération. Par conséquent, les cellules tumorales ont un intérêt évolutif à perdre leur capacité à produire et

à répondre à l'interféron type I et c'est sans doute la raison principale qui fait qu'elle est souvent déficiente dans les tumeurs. Les bases moléculaires exactes du rôle des IFN type I dans l'apoptose ont été relativement peu décrites et ne sont pas très claires à l'heure actuelle. En effet, il semble que certains ISGs jouant un rôle dans l'activité antivirale régulent aussi la prolifération cellulaire et l'apoptose[300]. La PKR a ainsi été décrite pour être impliquée dans les activités antiprolifératives des IFNs et une déficience de la PKR aboutit à une croissance accrue des cellules en culture et induit la formation de tumeurs chez la souris[300]. De plus, le gène suppresseur de tumeur p53, a aussi été décrit comme induit par le système IFN menant à l'apoptose de la cellule[301]. D'autre part, il a été démontré que, dans les tumeurs du sein, de la tête et du cou, mais aussi dans certains cas de leucémies et de lymphomes, l'activité du facteur STAT-1 est dérégulée [302]. L'implication de cette protéine dans la cancérogenèse est complexe. Différentes fonctions de la protéine sont mises en jeu, notamment ses capacités d'inhibition de l'apoptose et de la croissance cellulaire [303], [304]. De plus, la signalisation de la réponse IFN de type I est souvent compromise par une perte homozygote du cluster de gènes codant pour les IFN de type I sur le chromosome 9p21. Cette mutation a été retrouvée dans certains cancers et est associée à un mauvais pronostic [305], [306].

De ce fait, ces défauts au niveau de la voie de signalisation des interférons de type I [86], [88], fréquemment observés dans les cellules tumorales, sont exploités par les virus oncolytiques naturellement ou génétiquement modifiés. Ceci permettrait une meilleure réplication virale chez ces cellules par rapport aux cellules saines [307] (**Figure 11**). Plusieurs types de cancers ont cette voie inactivées, soit par la réduction de l'expression de l'IFN de type I ou une limitation de ses signaux par l'expression réduite des récepteurs ou l'altération de la signalisation en aval. Ainsi, les virus oncolytiques voient leur spécificité augmenter pour les cellules et l'environnement tumoral dans lesquels les réponses IFN de type I sont limitées.

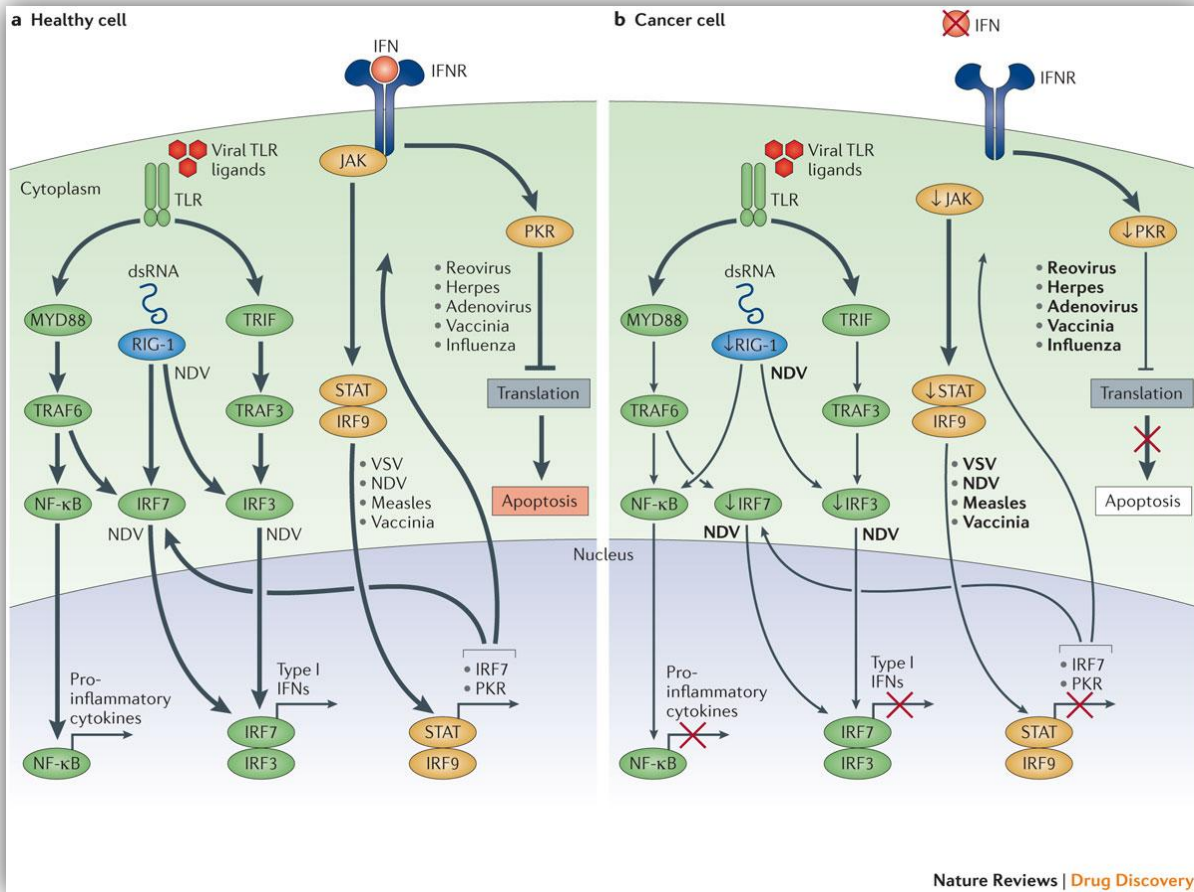


Figure 11. Réplication sélective des virus oncolytiques dans les cellules tumorales.

a) Suite à une infection virale, les cellules normales activent une voie antivirale qui permet la limitation de la multiplication virale. La reconnaissance virale débute grâce à la détection des motifs viraux appelés PAMPs qui activent les récepteurs Toll-like (TLR) ou les récepteurs RIG-I-like (RLR). Une fois le virus est détecté, plusieurs événements peuvent activer les protéines cellulaires clés dans la réponse antivirale innée. b) Dans les cellules cancéreuses, ce processus est perturbé ce qui rend les cellules cancéreuses plus sensibles à la réplication virale [47]

Le VSV peut ainsi se répliquer préférentiellement dans les cellules tumorales ayant un défaut dans la voie d'activation des interférons [308], ce qui est le cas de près de 80 % des tumeurs humaines [68], [69]. En effet, la protéine de la matrice de ce virus permet de bloquer l'exportation d'ARN messager via son interaction avec le complexe de polymérase cellulaire et le complexe d'initiation eIF4F respectivement, et donc d'inhiber la sécrétion d'IFN. La souche VSVA51 présente des mutations au niveau de cette protéine permettent la réplication du virus spécifiquement dans les cellules tumorales déficientes pour la réponse IFN de type I [69], [88]. En revanche, sa réplication est fortement inhibée par les IFN de type I produits par les cellules saines qui possèdent une réponse antivirale innée intacte. En

outre, un VSV recombinant pour l'IFN- β a été créé afin d'améliorer la spécificité du VSV envers les cellules tumorales. Ce virus a été testé contre différents cancers[309]–[311]. Il se réplique efficacement dans les cellules tumorales insensibles à l'IFN- β produit, mais il induit un état anti-viral dans les cellules saines, améliorant sa sécurité d'utilisation en réduisant l'effet cytopathique sur les tissus sains [86]. Par ailleurs, des études sur le mécanisme de résistance des cellules tumorales à l'infection par le VSV ont démontré une hétérogénéité de sensibilité pour différents types de cancers tels que le mélanome, selon l'état de la réponse IFN de type I dans ces cellules[312]. Il a été décrit que les cellules tumorales pancréatiques résistantes à l'infection exprimaient constitutivement les protéines antivirales Mx1 et OAS, qui peuvent être des biomarqueurs de la sensibilité à l'infection par le VSV [313].

Pour le MV, en plus de la densité du récepteur CD46, les défauts de la réponse IFN de type I souvent présents dans les cellules tumorales pourrait être un des mécanismes qui influencent l'efficacité de l'infection [154]. En effet, l'atténuation du virus de la rougeole le rend naturellement sensible à la réponse antivirale IFN de type I. Des études récentes ont démontré que la signalisation induite par les IFN de type I peut induire l'arrêt de la synthèse protéique des cellules exposées au virus, ce qui limiterait la propagation du virus dans la culture cellulaire. Cela génère des phénomènes de résistance à la virothérapie par le MV. Ainsi, le potentiel oncolytique du virus de la rougeole (MV) dans quelques lignées cellulaires de sarcome a été corrélé négativement avec la régulation positive de l'expression des molécules RIG-I et de l'ISG IFIT1 (Interferon-induced protein with Tetratricopeptide repeats 1). Dans les lignées cellulaires résistantes au MV, l'inhibition de la réplication virale a été corrélée avec une forte expression, constitutive ou induite par le MV, des détecteurs intracellulaires du virus RIG-I et Mda5, et de l'ISG IFIT1 qui inhibe la phosphorylation de STAT1 induite par le MV. En revanche, les lignées cellulaires sensibles ont montré une expression beaucoup plus faible d'IFIT1. Le pré-traitement des lignées sensibles avec l'IFN- β exogène les rendent plus résistantes à l'infection par le MV [154]. Le même groupe a étudié l'impact de la réponse IFN de type I dans l'efficacité du MV équipé d'un gène suicide codant pour la Super-Cytosine Deaminase (SCD) (MeV-SCD) sur 54 lignées cellulaires provenant du panel NCI-60 et incluant des lignées tumorales de mélanome, de cancer du sein, de cancer ovarien, de cancer de la prostate, de cancer du rein et de cancer du côlon [314]. Il a été démontré que cinq lignées parmi les 54 sont résistantes au MV oncolytique et que la résistance dans quatre de ces lignées est due à la phosphorylation de STAT1 et à l'expression de l'ISG IFIT1. Une seule lignée résistante ne montre aucune réponse IFN de

type I induite par le MV. Une autre étude, menée sur quatre lignées de leucémies à cellules T de l'adulte (ATL, Adult T cell Leukemia) et deux lignées T CD4+ contrôles [315], a démontré que la sécrétion d'IFN- β inhibe l'infection par le MV de deux lignées sur les six testées ; les lignées sensibles présentaient notamment des défauts de production d'IFN de type I et de réactivité aux IFN de type I exogènes. Une étude menée sur sept lignées de cancer du poumon a mis en évidence une lignée résistante à l'infection par le MV Edmonston [316]. Les résultats suggèrent que le mécanisme de résistance est dû à l'activité antivirale de la protéine PKR, induisant la phosphorylation du facteur EIF2 α , inhibant ainsi la réplication du MV dans la lignée résistante. Enfin, une étude récente réalisée dans notre laboratoire sur 22 lignées de mésothéliome humains a démontré que toutes les lignées tumorales résistantes la réplication du MV (7/22) et quatre types de cellules saines sont capables de produire des IFN de type I (IFN- α et IFN- β), ce qui conduit à la transcription de gènes stimulés par les IFN (ISG) tels que Mx1, bloquant ainsi la réplication du MV. En revanche, la majorité des lignées de mésothéliome sensibles au MV (11 sur les 15) ne produisent pas d'IFN de type I et n'expriment pas Mx1 en réponse à l'infection. L'ensemble de ces résultats soulignent le rôle important de la réponse antivirale IFN de type I dans la sensibilité ou la résistance des cellules tumorales au MV.

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

L'utilisation des virus oncolytiques dans le traitement des cancers représente aujourd'hui une alternative innovante pour cibler spécifiquement les cellules tumorales, favorisant les réponses anti-tumorales par un double mécanisme d'action associant la destruction sélective des cellules cancéreuses et l'induction d'une immunité anti-tumorale systémique.

Cette thérapie se base sur la capacité qu'ont certains virus à infecter spécifiquement les cellules tumorales, exploitant des propriétés que ces cellules ont acquises pendant le développement de la tumeur. Récemment, des études cliniques ont obtenu des résultats encourageants avec notamment l'utilisation du virus de l'herpès modifié (T-vec) en phase III pour le traitement du mélanome métastatique. En se basant sur ces résultats, la FDA américaine a opté pour autoriser la commercialisation du T-VEC.

La souche vaccinale du virus de la rougeole (MV), possède des propriétés oncolytiques intéressantes : elle cible préférentiellement les cellules tumorales surexprimant son récepteur (CD46) et entraîne la mort des cellules induisant une réponse immunitaire anti-tumorale. Ce virus est capable d'infecter les cellules tumorales et de les tuer, sans avoir d'effet nocif sur les cellules saines. Plusieurs études ont montré l'efficacité oncolytique du MV *in vitro* et *in vivo* chez la souris envers divers types de cellules tumorales et est actuellement à l'essai au niveau clinique chez l'homme. L'équipe du Dr Marc Grégoire, au sein de laquelle j'effectue ma thèse, développe la stratégie de virothérapie anti-tumorale basée sur l'utilisation du virus atténué de la rougeole MV, en collaboration avec le Dr Frédéric Tangy de l'Institut Pasteur de Paris.

Mes travaux de thèse explorent l'utilisation de la souche vaccinale du virus de la rougeole (MV) comme une nouvelle stratégie de traitement du mélanome, un cancer résistant aux traitements anti-tumoraux, notamment aux stades avancés. Le mélanome métastatique reste à l'heure actuelle une pathologie dramatique avec une survie moyenne de 13 mois après le diagnostic, notamment à cause d'une résistance aux traitements anti-tumoraux. Ces dernières années, le traitement du mélanome métastatique a été révolutionné par le développement d'immunothérapies et de thérapies ciblées qui ont, pour la première fois, montré un bénéfice significatif sur la survie globale. Cependant, d'autres approches thérapeutiques doivent être étudiées afin d'améliorer la prise en charge de cette pathologie.

Le premier objectif de ce travail de thèse a consisté à caractériser les propriétés oncolytiques du MV sur des lignées cellulaires de mélanome en analysant l'expression des récepteurs d'entrée connus, la cinétique d'infection et l'induction de la mort des cellules infectées *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin de xénogreffes de tumeurs humaines. En parallèle, nous avons vérifié que le MV préservait les cellules saines susceptibles d'être au contact du virus lors d'une injection chez le patient.

Le deuxième objectif de ce projet a été d'expliquer les différences de sensibilité à l'infection par le MV entre les lignées, en étudiant les mécanismes qui pourraient intervenir dans le degré de sensibilité des cellules tumorales. J'ai tout d'abord démontré une expression suffisante du récepteur CD46, qui est nécessaire pour la fusion, la formation de syncytia et la lyse cellulaire. Cependant, la sensibilité des lignées de mélanome à l'infection ne peut pas être seulement expliquée par le niveau d'expression de la molécule CD46. C'est pourquoi je me suis aussi intéressée à définir plus précisément les mécanismes régissant la sensibilité des lignées de mélanome à l'infection et à la réplication du virus en étudiant notamment la réponse antivirale IFN de type I en réponse à l'infection par le virus MV.

RÉSULTATS

Article: "Modulation of the type I interferon response influences the sensitivity of human melanoma cells to oncolytic measles virus"

Objectifs :

Le mélanome est la forme la plus agressive de cancer de la peau et son incidence à travers le monde ne cesse de s'accroître. Si les formes précoces de mélanome peuvent être traitées avec succès par la chirurgie, il existe peu de traitements efficaces pour les formes avancées. Il est donc nécessaire de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans cette optique, nous développons la stratégie de la virothérapie anti-tumorale basée sur l'utilisation du virus atténué de la rougeole (Measles Virus, MV). La virothérapie anti-tumorale consiste en l'utilisation de virus oncolytiques, capables de cibler les cellules tumorales de façon spécifique. Ce pouvoir oncolytique a ainsi été montré pour les souches atténuées du virus de la rougeole qui présentent deux avantages majeurs : un tropisme naturel pour les cellules tumorales humaines qui surexpriment le récepteur CD46 et une sécurité d'utilisation confirmée par leur utilisation à grande échelle lors des campagnes de vaccination. Les travaux précédents de l'équipe ont mis en évidence les propriétés oncolytiques du virus MV atténué (souche Schwarz) contre des lignées tumorales de mésothéliome pleural malin. Par ailleurs, l'action oncolytique du MV a été démontrée contre d'autres types de tumeurs dont les lymphomes, glioblastomes, le myélome multiple, les cancers ovariens. Dans cette étude, nous avons étudié *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin de xénogreffe tumorale, l'activité oncolytique du MV contre le mélanome.

Méthodes :

Nous avons étudié *in vitro* et *in vivo* la sensibilité de 13 lignées de mélanome établis dans notre laboratoire, ainsi que la sensibilité des cellules saines (mélanocytes). Dans un modèle murin de xénogreffe tumorale, le traitement par le MV induit des régressions tumorales importantes pour les lignées cellulaires sensibles, mais d'autres sont totalement insensibles entraînant une croissance rapide de la tumeur. Afin d'expliquer les différences de sensibilité observées entre les lignées de mélanome, nous avons analysé l'expression de CD46 à leur surface ainsi que la réponse antivirale interféron (IFN) de type I développée en réponse au MV.

Résultats :

Nos résultats montrent que 10 lignées de mélanomes sur les 13 testées sont efficacement infectées et lysées par le MV, tandis que les mélanocytes ne sont pas sensibles. Les lignées

sensibles étudiées sont efficacement infectées à 72h post-infection *in vitro*. L'infection conduit à la mort des cellules tumorales.

Afin de confirmer, *in vivo*, les résultats obtenus *in vitro*, nous avons développé un modèle de xéno greffe de cellules tumorales humaines sur des souris *nude*. Nous avons étudié deux lignées sensibles à l'infection et une lignée résistante à l'infection. Une injection intratumorale unique de $1,5 \cdot 10^7$ TCDID₅₀ de MV a permis de réduire le volume de tumeurs des lignées sensibles, tandis que les lignées résistantes sont totalement insensibles, entraînant une croissance rapide de la tumeur.

Nous avons mis en évidence que les cellules expriment toutes la molécule CD46, le récepteur principal du MV, et que son niveau d'expression est hétérogène entre les lignées cellulaires. Cependant, la sensibilité de ces lignées au MV ne corrèle pas avec le niveau d'expression de CD46 à leur surface. Afin de corréliser ces différences de sensibilité à l'infection par le MV entre les lignées avec le mécanisme de la réponse antivirale innée, nous avons étudié les étapes importantes de la voie de signalisation IFN de type I. En effet, les lignées cellulaires résistantes ont été capables d'exprimer fortement la protéine antivirale Mx1 48h post infection, en revanche, les cellules tumorales capables de répliquer le virus MV possèdent des anomalies dans leur réponse IFN de type I.

Le traitement de cellules sensibles au MV par des IFN de type I permet de bloquer leur infection, tandis que l'utilisation du Ruxolitinib, qui inhibe la signalisation du récepteur IFNAR en réponse aux IFN de type I, sur les lignées résistantes, permet de rendre celles-ci sensibles à l'infection.

Conclusion :

En conclusion, nos résultats confirment le potentiel oncolytique du virus atténué de la rougeole contre les cellules de mélanome. Nous montrons que la sensibilité des cellules de mélanome au virus MV semble dépendante à la fois du niveau d'expression de CD46 et des défauts de la voie IFN de type I. Ces résultats suggèrent un rôle déterminant de la voie IFN de type I dans la sensibilité ou la résistance du mélanome à l'infection par le MV. Cela devra être pris en compte pour les futurs essais cliniques par le MV.

ARTICLE

Modulation of the Type I Interferon Response Defines the Sensitivity of Human Melanoma Cells to Oncolytic Measles Virus

Ferdous Allagui¹, Carole Achar¹, Clarisse Panterne¹, Chantal Combredet², Nathalie Labarrière¹, Brigitte Dréno^{1,3}, Amel Benammar Elgaaied⁴, Daniel Pouliquen¹, Frédéric Tangy², Jean-François Fonteneau¹, Marc Grégoire¹ and Nicolas Boisgerault^{1,*}

¹CRCNA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France; ²CNRS-UMR3569, Unité de Génétique Virale et Vaccination, Institut Pasteur, Paris, France; ³Département d'Onco-Dermatologie, Hôtel-Dieu, Nantes, France; ⁴Faculté des Sciences de Tunis, Université de Tunis El Manar, 1088 Tunis, Tunisie

Abstract: Background: Oncolytic viruses such as live-attenuated, vaccine strains of measles virus (MV) have recently emerged as promising cancer treatments, having shown significant antitumor activity against a large variety of human tumors.

Objective: Our study aims at determining which parameters define the sensitivity of human melanoma cells to oncolytic MV infection.

Method: We analyzed both *in vitro* and *in vivo* the oncolytic activity of MV against a panel of human melanoma cell lines established in our laboratory. We tested whether either type I interferons or the interferon pathway inhibitor Ruxolitinib could modulate the sensitivity of these cells to oncolytic MV infection.

Results: Human melanoma cells exhibit varying levels of sensitivity to MV infection in culture and as tumor xenografts. As these differences are not explained by their expression level of the CD46 receptor, we hypothesized that antiviral immune responses may be suppressed in certain cell lines resulting in their inability to control infection efficiently. By analyzing the type I IFN response, we found that resistant cells had a fully functional pathway that was activated upon MV infection. On the contrary, sensitive cell lines showed defects in this pathway. When pre-treated with IFN- α and IFN- β , all but one of the sensitive cell lines became resistant to MV. Cells resistant to MV were rendered sensitive to MV with Ruxolitinib.

Conclusion: Type I interferon response is the main determinant for the sensitivity or resistance of melanoma to oncolytic MV infection. This will have to be taken into account for future clinical trials on oncolytic MV.

ARTICLE HISTORY

Received: September 13, 2016

Revised: December 13, 2016

Accepted: December 22, 2016

DOI:

10.2174/1566523217666170102110502

Keywords: Melanoma, Interferon, Measles virus, Oncolytic, Cancer virotherapy, Ruxolitinib.

INTRODUCTION

Malignant melanoma is a very aggressive cancer that can easily metastasize and acquire resistance to therapy. Over the last decade, both checkpoint inhibitor immunotherapies such as anti-CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) and anti-PD-1 (Programmed cell death 1) [1, 2] and targeted therapies, like BRAF inhibitors [3, 4] have dramatically modified the treatment of this malignancy and have resulted in positive changes regarding overall survival. However, while these advancements are encouraging, additional efforts are needed to improve the clinical management of this disease and to set up combination therapies.

Oncolytic viruses (OVs) are novel anticancer agents that are now considered as a new class of cancer immunotherapy. Indeed, antitumor properties of OVs rely first on their ability to preferentially infect and kill tumor cells [5], but also on their capacity to stimulate tumor-specific immune responses [6]. A large variety of OVs have been evaluated in numerous preclinical studies and clinical trials and Talimogene laherparepvec (T-vec), an oncolytic herpesvirus, was recently approved for the treatment of unresectable metastatic melanoma in the USA and in Europe [7]. Live-attenuated, vaccine strains of measles virus (MV) have also emerged as promising oncolytic agents, having shown significant antitumor activity against different types of human tumors [8]. In clinical trials, oncolytic MV showed impressive clinical efficacy in patients with recurrent ovarian cancers, with the median of survival improved from 10.6 to 38.4 months when high doses of MV were used [9]. In patients with disseminated multiple myeloma, Russell and colleagues demonstrated for

*Address correspondence to this author at the INSERM UMR892 - CNRS UMR6299 - Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes - 8 quai Moncousu - BP70721 - 44007 Nantes Cedex 1 - France; Tel: (+33)228080236; Fax: (+33)228080204; E-mail: nicolas.boisgerault@inserm.fr

the first time the efficacy of a systemic treatment with oncolytic MV in two patients [10]. MV is currently evaluated for the treatment of other aggressive malignancies, including malignant pleural mesothelioma (MPM), metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck, and glioblastoma.

Live-attenuated MVs derived from the Edmonston strain use the CD46 molecule as their main entry receptor into cells [11]. CD46 level of expression was suggested to be critical for the sensitivity of tumor cells to oncolytic MV infection [12]. However, recent studies by our group and others revealed that defects in the type I interferon (IFN) innate antiviral response, which are commonly found in cancer cells, were central for tumor cell sensitivity to MV replication [13-15], as already described with other OVVs [16, 17]. In the case of oncolytic RNA viruses, the viral genome is usually recognized by the cytoplasmic helicases RIG-I (Retinoic acid-inducible gene 1 protein) and MDA5 (Melanoma differentiation-associated protein 5) [18, 19]. Stimulation of these sensors leads to the sequential production of IFN- β and IFN- α type I IFNs, which subsequently induce the expression of hundreds of IFN-stimulated genes (ISGs) through Interferon alpha/beta receptor 1 (IFNAR) signaling. When fully functional, this response restricts viral replication in both infected and neighboring cells.

To determine the potential of MV as an OV against human melanoma, we screened primary melanoma cells from 13 patients for their sensitivity to the oncolytic Schwarz strain of MV. We found that Schwarz MV could efficiently replicate in and kill 10/13 of these cell lines *in vitro*, without infecting healthy melanocytes. These results were confirmed *in vivo* in xenograft experiments in mice. We then determined that the level of expression of CD46 could not predict the sensitivity of melanoma cells to oncolytic MV, but that defects at different stages of the type I IFN response could make these cells sensitive to MV replication. Moreover, pre-treating human melanoma cells with type I IFNs or an inhibitor of IFNAR signaling could revert their sensitivity or resistance to MV replication.

These results confirm the interest of using OVVs against melanoma [7, 20] considering that a majority of tested patient-derived melanoma cells were efficiently targeted by oncolytic MV. Our results also suggest that prescreening of melanoma patients for defects in the type I IFN response in tumor cells may be necessary before treatment with OVVs and that future research on MV should consider strategies to specifically target the type I IFN response in tumor cells.

MATERIALS AND METHODS

Primary Melanoma Cells

Primary melanoma cells were obtained from fragments of metastatic tumors and registered in the Biocollection PC-U892-NL (CHU Nantes, France) with informed consent from patients. All cells were cultured at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, in RPMI -1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 2 mM L-glutamine (all from Gibco – Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France). Cells were routinely checked for mycoplasma contamination

using the PlasmotestTM (InvivoGen, Toulouse, France). Primary human melanocytes were cultured in supplemented medium 254 HMGs (Life Technologies - Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France).

Measles virus Infection

Live-attenuated, vaccine Schwarz strain of measles virus (MV) expressing the enhanced Green Fluorescent Protein (MV-eGFP) was produced and titered on Vero cells as previously described [21]. One day after plating, cells were infected in 24-well plates (1×10^5 cells per well) at an MOI of 1 for 2 h at 37°C. Viral inoculum was then replaced by fresh culture medium with no further renewal during the experiment. To assess infection yields, the percentage of eGFP⁺ cells was determined by flow cytometry using a BD FACSCalibur (Cytocell, SFR François Bonamy, Nantes, France). Cell viability was measured by TO-PRO[®]-3 iodide (Molecular Probes – Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) staining as recommended by the manufacturer. TO-PRO[®]-3 is a carbocyanine monomer nucleic acid with far-red fluorescence that enters only in dead cells and stains the DNA. All flow cytometry analyses were performed using the FlowJo software (version 7.6.5, FlowJo LLC, Ashland, OR, USA).

Time-lapse Microscopy

Microscopy analyses were performed at the Cellular and Tissue Imaging Core Facility (MicroPICell, SFR François Bonamy, Nantes, France) using a Leica DMI6000B station (Leica Microsystems SAS, Nanterre, France). Images were acquired every 30 min for 5 days after MV infection using the MetaMorph Microscopy Automation & Image Analysis Software (version 7.8, Molecular Devices LLC, Sunnyvale, CA, USA). Images were then analyzed and edited using the FiJi software [22].

MV Entry Receptor Staining

A total of 1×10^5 cells were incubated with a FITC-conjugated anti-CD46, a PE-conjugated anti-CD150/SLAM (both from BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) or a PE-conjugated anti-Nectin-4 (R&D Systems Europe, Lille, France) antibody in PBS containing 0.1% bovine serum albumin for extracellular staining. After 30 min, cells were washed twice and resuspended in PBS before analysis by flow cytometry as described above. The results are expressed as relative means of fluorescence intensity (R-MFI) calculated by dividing the MFI of the staining of interest by the MFI of an appropriate isotype control.

Animal Studies

Six- to eight-week old female nude mice (Balb/c nu/nu) were obtained from Charles River Laboratories (Larbesles, France). Melanoma xenograft models were established by challenging nude mice subcutaneously in the flank with 2×10^6 tumor cells. When tumors reached a volume of approximately 150-200 mm³, mice were randomized into two groups and injected intratumorally with 50 µL of control saline (PBS) or MV-eGFP (1.5×10^7 TCID₅₀). Tumors were measured twice weekly with a microcaliper and tumor volumes were calculated using the $(\text{length}^2 \times \text{breadth})/2$ formula.

Animals were sacrificed when tumors reached a maximum of 1 cm³ in volume. Tumors were then harvested, weighed, fixed in 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA) and embedded in paraffin wax. All animal experiments were approved in accordance with the European Union regulations on the use of animals in cancer research under the agreement number 01257.03 delivered by the French Ministry of Research.

Quantitative Real-time PCR

Cells were infected with MV (MOI = 1) or left untreated. After 48h, total RNA from 5×10^6 cells was isolated using the Nucleospin[®] RNA II kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France). One μ g of RNA was then reverse-transcribed using the QuantiTect reverse transcription kit (Qiagen, Hilden, Germany). PCR reactions were conducted using the Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Villebon -sur-Yvette, France) and an Mx3005P qPCR system (Agilent Technologies, Les Ulis, France) according to the manufacturer's instructions. Primer pairs to detect *IFNA1* (IFN- α), *IFNB1* (IFN- β), *MX1* (Mx1), *DDX58* (RIG-I), *IFIH1* (MDA5) and *RPLPO* (RPLPO) were obtained from Qiagen (Hilden, Germany). Relative expression levels were calculated using human large ribosomal protein (*RPLPO*) as a reference gene.

Modulation of the Type I Interferon Response

Cells were seeded in 24-well plates (1×10^5 cells per well) and incubated overnight. IFN pretreatment was performed by incubating cultures with medium containing recombinant human rhIFN-alpha-2a and rhIFN-beta-1a (ImmunoTools, Friesoythe, Germany) at 10,000 U/mL 4 h before adding the virus (MOI = 1). Pretreatment with the pan-JAK inhibitor Ruxolitinib (InvivoGen, Toulouse, France) was performed 4 h before infection with MV at a concentration of 2 μ M.

Statistical Analyses

Analyses were performed with the GraphPad Prism software (version 6, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) using unpaired, non-parametric, one-tailed Mann-Whitney t-test to compare two independent groups. Differences were considered significant when $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ or $***P < 0.001$. All data are from at least three independent experiments and are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM).

RESULTS

Susceptibility of Melanoma Cells to MV Infection

To determine the proportion of human melanomas susceptible to MV infection, semi-confluent cultures of primary melanoma cells obtained from 13 patients treated in the Onco-dermatology Department of Nantes Hospital were infected with a live-attenuated Schwarz strain of MV expressing eGFP (MV-eGFP) at an MOI of 1. The percentage of infected cells, as indicated by eGFP expression, was evaluated over time for 72h post-infection by flow cytometry (Fig. 1A). Cells were also analyzed for their sensitivity to MV infection by fluorescence time-lapse microscopy for 120h

(Fig. 1B and supplemental Figs. S1 to S13) to observe the cytopathic effect of MV infection characterized by the formation of giant multinucleated cells (syncytia) resulting from the fusion of infected cells with neighboring cells. Melanoma cells from different patients showed a heterogeneous sensitivity to oncolytic MV infection (Figs. 1A & 1B), with ten of them found to be susceptible to infection. Of these, six showed an infection yield over 50% at 72h after infection, whereas the four others were infected slower. Three others (M17, M117 and M132) were barely infected by oncolytic MV and were shown to be able to control infection over time. As expected, healthy melanocytes were found to be resistant to oncolytic MV infection (Fig. 1C).

To quantify the cytotoxicity of MV against melanoma, cells were stained with TO-PRO[®]-3 iodide at 72h post-infection (Fig. 1D). Cell death induction correlated with the extent of MV infection, with seven cell lines exhibiting over 40% of TO-PRO-3 staining at the time of analysis. The three other MV -sensitive cell lines, M102, M113 and M67, were shown to undergo cell death at a later time (supplemental Figs. S1-13). All ten sensitive cell lines were completely eliminated from the culture dish after one week (data not shown). On the contrary, M17, M117 and M132 resistant cell lines were able to overcome viral infection and showed no sign of cytopathic effect usually associated with MV infection.

In Vivo Oncolytic Activity of MV Against Human Melanoma Xenografts

To confirm the ability of MV to specifically infect melanoma cells, we performed xenograft experiments in nude mice for two different MV-sensitive primary melanoma cell lines, M6 and M18, and one MV-resistant primary cell line, M117. Intratumoral injection of MV resulted in rapid tumor regression for M6 ($70.95 \text{ mm}^3 \pm 40.96$ vs $305 \text{ mm}^3 \pm 39.53$; $P = 0.0007$; Fig. 2A) and M18 ($34.31 \text{ mm}^3 \pm 30.25$ vs $405.2 \text{ mm}^3 \pm 137.8$; $P = 0.0286$; Fig. 2B) xenografts, as compared to PBS-treated control animals. Of note, 5/10 M6-challenged, MV -treated animals were tumor-free at day 20 after treatment, while 2/4 M18 tumors were completely eradicated 12 days after MV injection. On the contrary, M117 xenografts treated with MV were completely insensitive to the oncolytic effect of MV, resulting in a rapid tumor growth similar to PBS -treated animals ($368.9 \text{ mm}^3 \pm 86.86$ vs $353.5 \text{ mm}^3 \pm 62.71$; $P = 0.4286$; Fig. 2C).

In order to better characterize the antitumor effects of oncolytic MV *in vivo*, we performed a histological analysis of M6 tumors treated by MV or PBS (Fig. 3). In the residual M6 tumors treated by MV, we observed the presence of syncytia and infiltration of macrophages (Fig. 3A). Tumor regressions were also associated with the formation of fibrotic tissue in place of the tumor cells. Extended zones of ongoing cell death were also observed by staining of activated caspase-3 in injected tumors (Fig. 3B). These cytotoxic effects were not observed in control animals that showed homogeneous tumor tissue with no sign of either MV-related cytopathic effects or activated caspase-3. These results confirm that MV exerts its oncolytic activity against a majority of patient-derived primary melanoma cells both *in vitro* and *in vivo*.

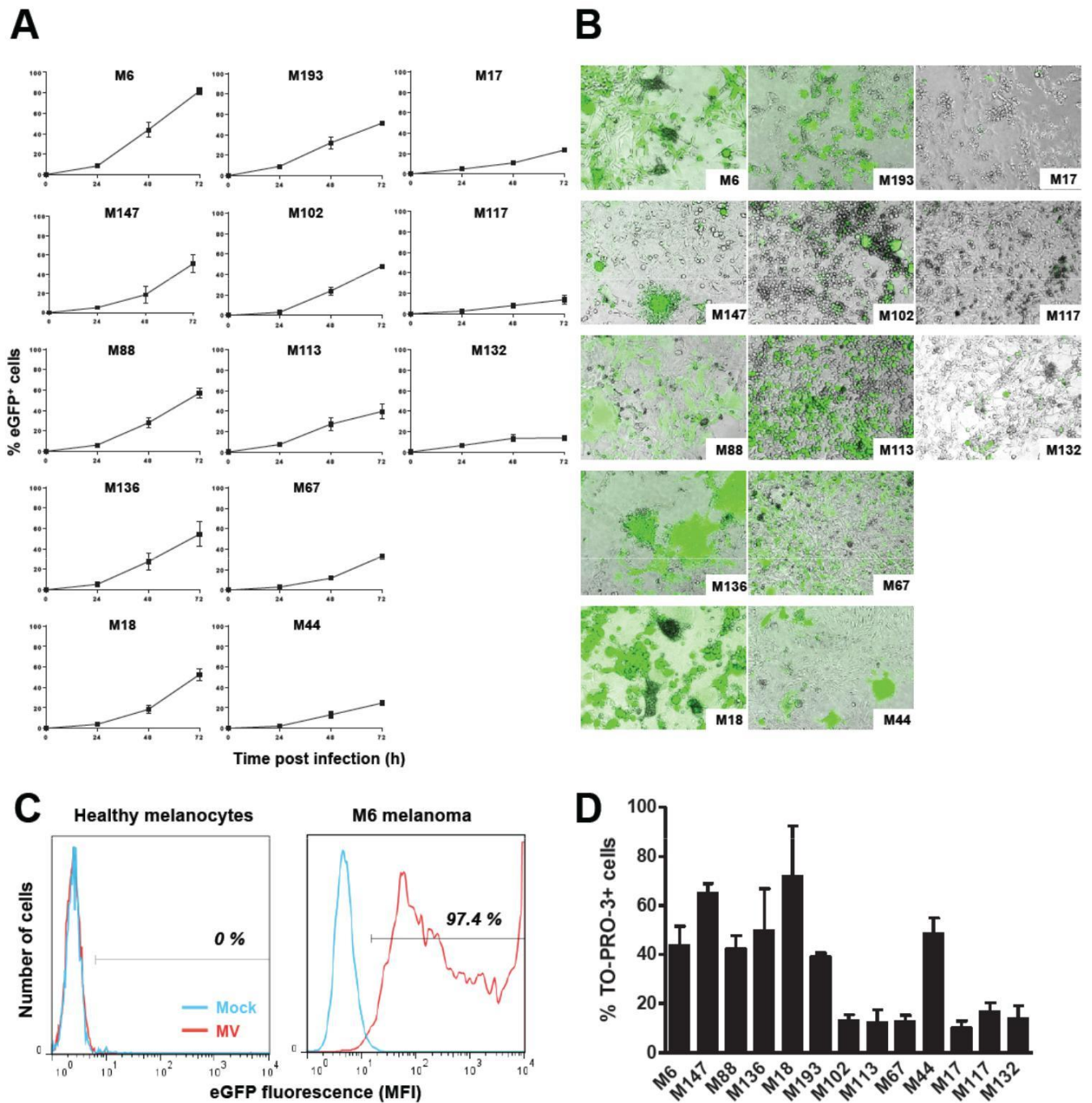


Fig. (1). Infection of human melanoma cell lines with oncolytic measles virus.

A. Melanoma cells were infected with MV-eGFP (MOI = 1) and analyzed 24, 48 and 72h later by flow cytometry for eGFP expression. **B.** MV-eGFP-infected melanoma cells were analyzed by fluorescence microscopy at 96h after infection (MOI = 1). **C.** Healthy human melanocytes and M6 melanoma cells were infected with MV-eGFP (MOI = 1) and analyzed 72h later by flow cytometry to evaluate eGFP expression. The percentage of infected eGFP⁺ cells is indicated. **D.** Viability of MV-infected cells was assessed 72h after infection by flow cytometry following TO-PRO-3 staining. Data are presented as mean ± SEM of at least three independent experiments.

Expression of Measles Virus Receptors on Melanoma Cells

To better understand what defines the sensitivity of melanoma cells to oncolytic MV, we analyzed the surface expression of all known receptors of this virus. CD46 has been considered to be critical for MV-based cancer therapy as it is overexpressed in several tumor types and has been

shown to be necessary for the oncolytic activity of MV. We found that CD46 was expressed on all 13 melanoma cell lines (Fig. 4A), but only three of them, M6 (R-MFI = 5.62), M18 (8.88) and M136 (7.04), exhibited a strong overexpression compared to normal melanocytes (R-MFI = 1.99). CD46 expression did not correlate with infection yields observed in (Fig. 1A) as several highly sensitive cells only displayed basal expression of CD46. Moreover, the

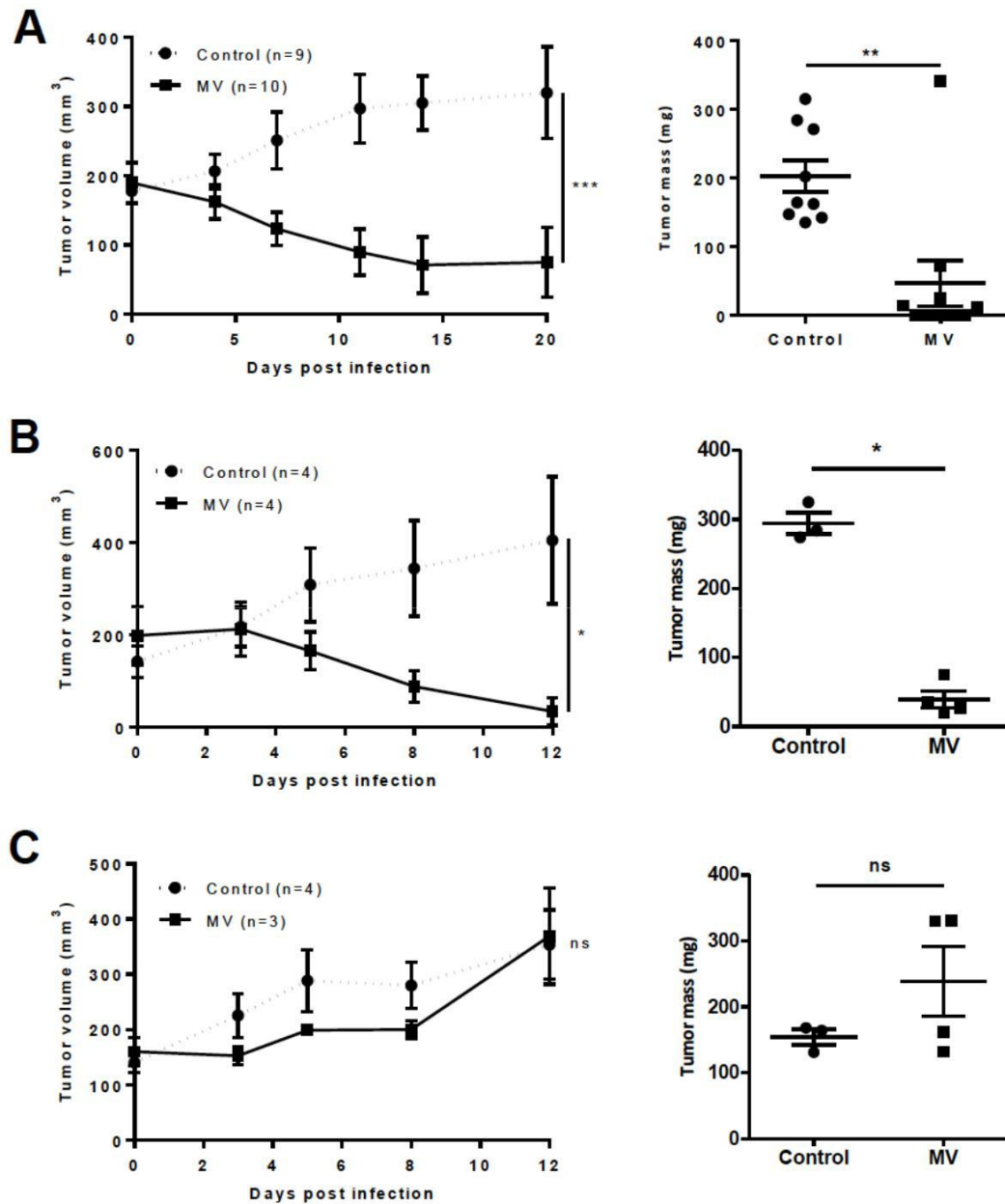


Fig. (2). MV exhibits oncolytic properties *in vivo* against human melanoma.

M6 (A) and M18 (B) MV-sensitive cells and M117 (C) MV-resistant cells were grown as subcutaneous xenografts in nude mice. Grown tumors were injected with MV-eGFP (1.5×10^7 TCID₅₀) or PBS (control groups). Tumor growth was followed up to 20 days. At the end of the experiment, tumors were harvested and weighed. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; one-tailed Mann-Whitney).

MV-resistant M117 cells showed a higher expression of CD46 (4.28) than seven out of ten MV-sensitive cell lines.

CD150/SLAM and Nectin-4 are two other surface molecules used as entry receptors by both wild-type and vaccine strains of MV. We observed that M88 and M44 expressed CD150/SLAM at a very low level (supplemental Fig. S14), whereas M193 expressed Nectin-4 at a similarly low level (supplemental Fig. S15). All other cells did not express CD150/SLAM nor Nectin-4 at their surface. Overall, the expression of the different cell receptors for MV did not explain the differences observed regarding the sensitivity of melanoma cells to oncolytic MV infection.

Role of the Type I Interferon Response

We recently demonstrated that the sensitivity of human MPM cells to oncolytic MV largely depends on the status of the type I IFN response in these cells [13]. Therefore, we postulated that innate immunity, and specifically the type I IFN response, might be responsible for the variable sensitivity of melanoma cells to MV. We thus analyzed the expression, in both untreated and MV-infected cells, of different players of the type I IFN response. We first analyzed at the mRNA level the expression of two viral nucleic acid sensors, the helicases *RIG-I* and *MDA5*. We observed that the expression of both these genes was induced upon infection in all 13 melanoma cell lines (Fig. 4B). This indicates that MV is

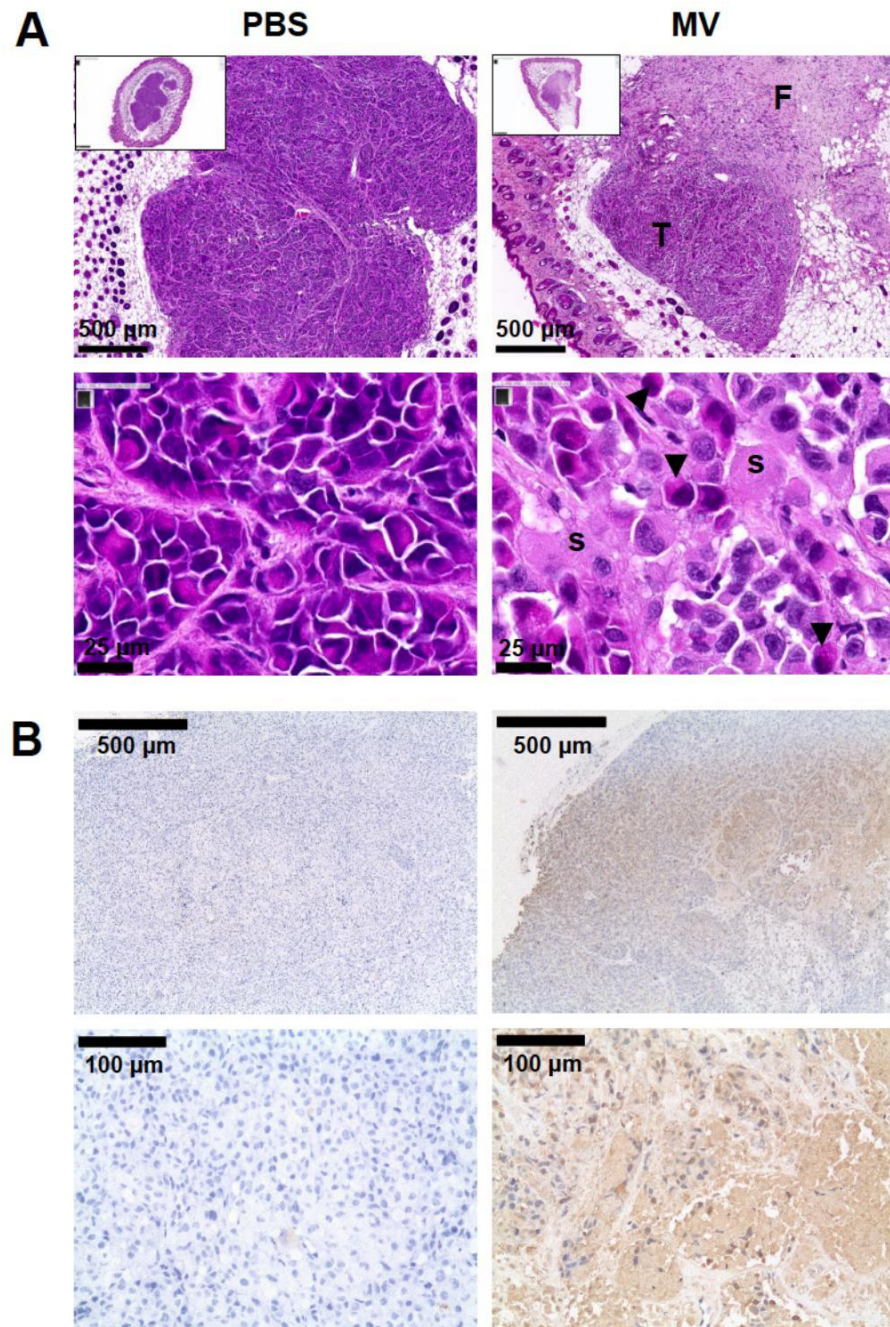


Fig. (3). Histological analysis of the antitumor effects of oncolytic MV against human melanoma.

M6 melanoma tumors harvested 20 days after treatment from PBS or MV-treated mice were stained with HPS (A) or with an anti-activated caspase-3 antibody (B). T: tumor; F: fibrosis; s: syncytia; arrowheads: macrophages.

actually detected by all cells, thus confirming that the virus enters all of them whatever is the level of expression of the different surface receptors described above.

We next examined the expression of both *IFN-β* and *IFN-α* that are sequentially induced after recognition of viral RNA by RIG-I and MDA5 (Fig. 4C). We found that MV infection induced *IFN-β* expression in all melanoma cells but the MV-sensitive M147. Accordingly, M147 did not express *IFN-α* following MV infection. Three other cell lines, M44, M88 and M113 failed to express *IFN-α* despite expressing *IFN-β*. This shows that several MV-sensitive cell lines have

defects in type I IFN production that make them unable to block efficiently oncolytic MV infection.

Type I IFNs signal through the IFNAR receptor, which ultimately leads to the expression of ISGs. To verify whether such a complete type I IFN response could be achieved in the tested cells, we analyzed the expression of one of these ISGs, *MXI* (Fig. 4D), that we previously showed to be of interest when trying to predict the sensitivity of mesothelioma cells to MV replication [13]. As expected, the four types of cells (M44, M88, M113 and M147) that showed defects in type I IFN expression failed to express *MXI* after MV infection.

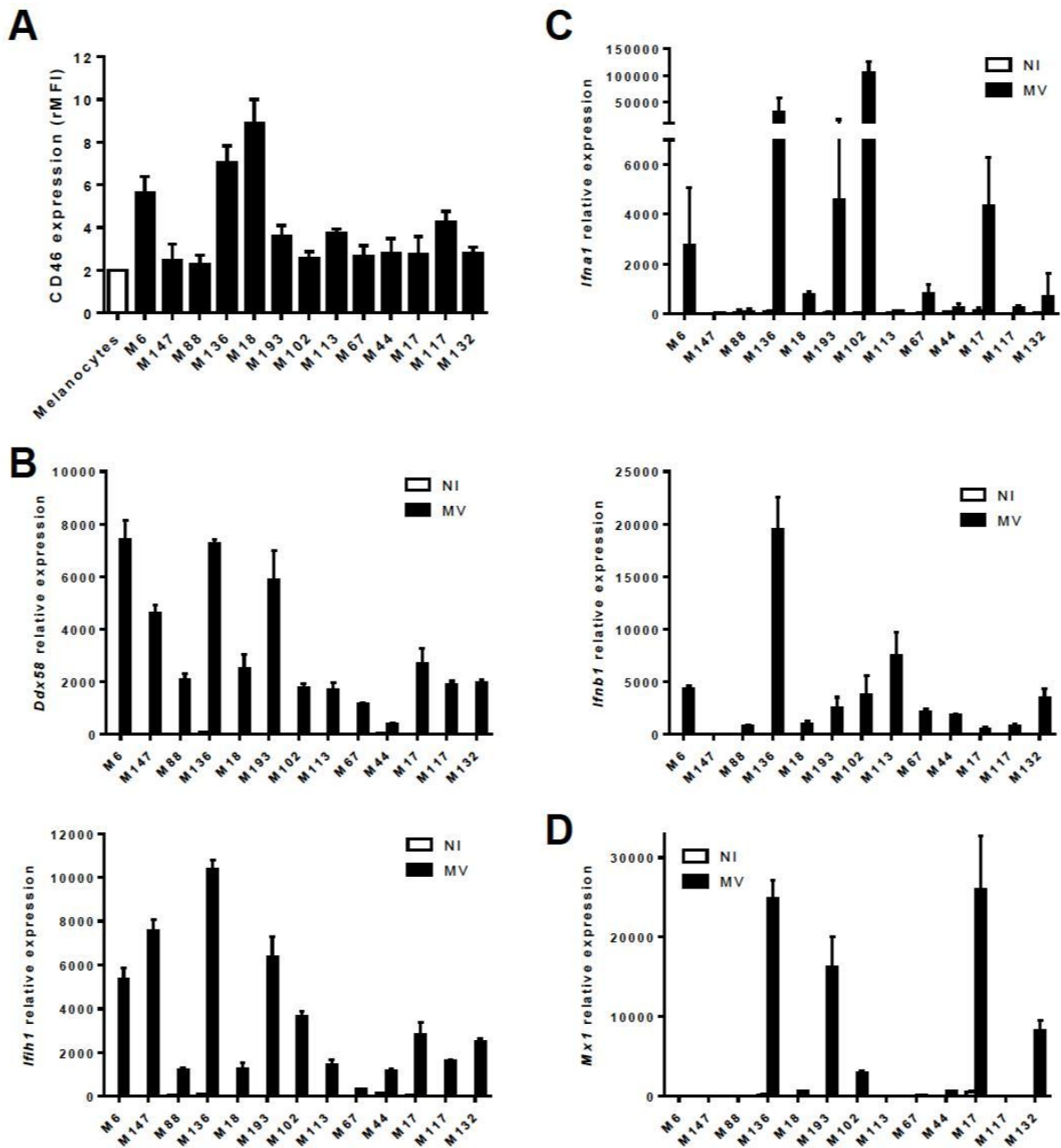


Fig. (4). Expression of MV receptors and innate antiviral proteins in melanoma cells.

A. Expression of the CD46 receptor was analyzed at the surface of melanoma cells by flow cytometry. **B-D.** Melanoma cells were infected with MV (MOI = 1) or left untreated. Expression of several genes of the type I IFN response was analyzed at the mRNA level 48h after infection. Relative expression of *DDX58* (RIG-I), *IFIH1* (MDA5) (**B**), *IFNA1* (IFN- α), *IFNB1* (IFN- β) (**C**) and *MX1* (**D**) was normalized with the housekeeping gene *RPLPO*. Results are presented as mean \pm SEM from three independent experiments.

Three other MV-sensitive cell lines (M6, M18 and M67) did not express *MX1* after infection, suggesting defects in the type I IFN pathway downstream of IFNAR. Surprisingly, three MV-sensitive cell lines (M102, M136 and M193) were still able to express *MX1*, indicating that other unidentified ISGs that may be critical to restrict MV replication may be missing in these cells. On the opposite, we found that the MV-resistant M117 cells did not express *MX1*, which suggests that these cells may exhibit defects in the type I IFN pathway but with no impact on the ISGs controlling MV replication. However, when looking at the expression of other ISGs that have been

described in the literature to potentially restrict MV replication (*ADARI*, *IFIT1*, *IRF2*, *RSAD2*, *TRIM25* and *p48*), we were not able to pinpoint a better marker than *MX1* to predict sensitivity to MV. Indeed, all these ISGs were induced after MV infection similar to what was observed with *RIG-I* and *MDA5* (supplemental Fig. **S16**).

Altogether, our results showed heterogeneity in melanoma cells regarding the alterations in the type I IFN pathway. Depending on patients, defects in antiviral signaling can be found either upstream or downstream of IFNAR signaling.

Modulation of the Type I IFN Response Modifies the Sensitivity of Melanoma Cells to Oncolytic MV

To confirm that the type I IFN pathway played a critical role in the control of oncolytic MV replication in melanoma cells, we pretreated MV-sensitive cells with both IFN- α and IFN- β before infecting them with MV (Fig. 5A). Nine out of ten of these cell lines showed a decreased infection yield 72h later, even if we were not able to completely abolish MV replication. We also tested whether inhibiting type I IFN signaling could render resistant melanoma cells sensitive to MV. To do so, we pretreated M17, M117 and M132 cells with Ruxolitinib, an inhibitor of the JAK kinases JAK1 and JAK2 that are involved in the signaling downstream of the IFNAR receptor. As expected, the three cell lines were more efficiently infected when pre-treated with Ruxolitinib before exposure to MV (Fig. 5B). This showed that either activation or inhibition of the type I IFN response can render cells resistant or sensitive to oncolytic MV infection, respectively.

DISCUSSION

Oncolytic viruses such as live- attenuated MV vaccine strains are promising agents for the treatment of aggressive malignancies. The recent approval of the herpesvirus T-vec for the treatment of unresectable metastatic melanoma confirmed that such a therapeutic approach could be efficient for this disease. It was recently described that MV infection of melanoma cells could induce immunogenic responses complementing the oncolytic properties of the virus [20]. These results suggested that oncolytic MV could be a potential treatment for human melanoma. Thus, we sought to determine which proportion of patients with melanoma would be eligible for MV treatment and which cellular mechanisms could determine melanoma cell sensitivity to this virus, based on our recent study on another aggressive cancer, mesothelioma [13].

Here we demonstrate that a majority (10/13, 77%) of patient-derived primary human melanoma cells are sensitive to oncolytic MV. These cells can be efficiently infected and killed by the virus, both *in vitro* and *in vivo* in animal mod-

els, depending mainly on their inability to mount a complete type I IFN response. Alterations in this critical innate antiviral pathway render cells sensitive to MV replication and killing, which can be partially reversed by using exogenous type I IFN. On the opposite, healthy cells and tumor cells with intact type I IFN response can control MV replication over time and resist the oncolytic effects of the virus. By inhibiting the type I IFN response with Ruxolitinib, we were able to render MV-resistant melanoma cells sensitive to oncolytic MV infection. Enhancement of the oncolytic activity of MV by Ruxolitinib appears as of great clinical interest for patients with tumors that are still competent for the type I interferon response. Future work should focus on testing the combinatorial use of this drug with MV *in vivo* in appropriate animal models.

Sensitivity of human tumor cells to oncolytic MV has been traditionally linked to the overexpression of the CD46 molecule at the cell surface [12]. Indeed, CD46 is critical for attenuated MV to enter cells, but we show here that MV is able to enter all tested cells whatever level of CD46 they express, as shown by the induction of the expression of *RIG-I*, *MDA5* and several ISGs after exposure to MV. We and others recently demonstrated that alterations in the type I IFN signaling were critical to allow replication of MV in different types of tumors [13-15] and human melanoma cells have been previously described to exhibit defects in this type I IFN response [23]. Price and colleagues reported that cells from metastatic melanoma are usually able to express *IFN- β* but then fail to express *IFN- α* due to their inability to activate promoters of the different *IFN- α* genes, thereby impairing the downstream response of innate antiviral immunity. We found that a majority of the cells tested here showed similar defects at the level of type I IFN production. Interestingly, all but one of the MV-sensitive cell lines can respond to exogenous type I IFN, resulting in inhibition of MV replication in these cells. Even if expected for cells unable to express *IFN- α* , this finding also shows that the others may produce levels of *IFN- α* that are too limited to efficiently activate a full type I IFN response and restrict MV replication, or even that the endogenous type I IFNs produced by these

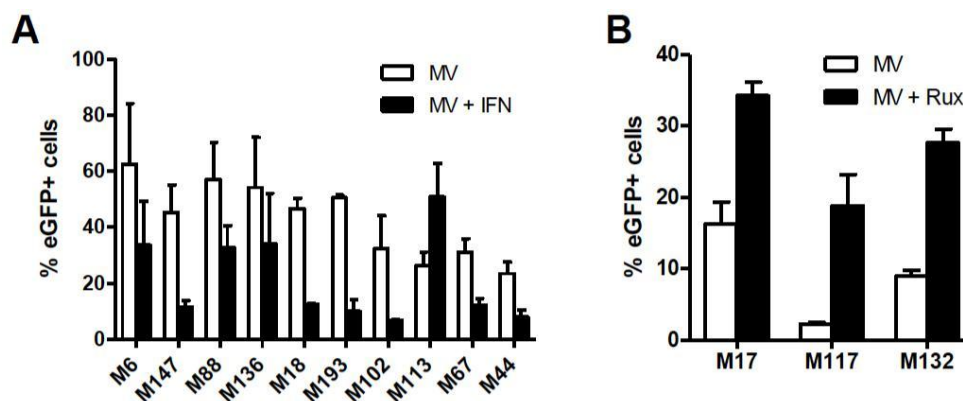


Fig. (5). Modulation of the type I interferon response influences sensitivity to oncolytic MV.

A. Cells were either left untreated or treated with IFN- α + IFN- β (10,000 U/mL) 4h before infection with MV-eGFP (MOI = 1). The percentage of cells expressing eGFP was determined 72h later by flow cytometry. **B.** Cells were either left untreated or pretreated with Ruxolitinib (2 μ M) for 4h before infection with MV-eGFP (MOI = 1). The percentage of cells expressing GFP was determined 72h later by flow cytometry. Results are presented as mean \pm SEM of three independent experiments.

cell lines are ineffective at signaling through the IFNAR receptor. We also previously found that MV-resistant mesothelioma cells would express genes that are involved in the type I IFN response at a basal level before any exposure to MV. Our results suggested that these cells would be protected more rapidly from MV infection and thus be more resistant to oncolytic MV therapy [13]. For melanoma, we did not see any basal expression of these genes in the three MV-resistant cell lines before infection. In order to better screen melanoma patients for the susceptibility of their tumor to oncolytic MV treatment and maximize its clinical efficacy, it will be critical to identify additional markers of sensitivity to OVs in the future.

Regarding treatment safety, a previous study by Donnelly and colleagues first described the sensitivity of four human melanoma cell lines to an oncolytic strain of MV but also reported that healthy melanocytes were susceptible to MV replication, which could jeopardize the use of oncolytic MV in patients [20]. Here, we found that healthy melanocytes were not infected by oncolytic MV, in accordance with several observations in oncolytic virus research that such viruses are in an overwhelming majority unable to replicate in healthy cells that do not exhibit critical alterations that are found in tumor cells.

In conclusion, we demonstrated that oncolytic MV could be a relevant therapeutic alternative for patients with melanoma. Indeed, MV, as other oncolytic viruses, efficiently targets and kills melanoma cells by exploiting their genetic alterations. Since it was also previously shown that oncolytic MV efficiently activates specific antitumor immune responses [20, 24, 25], one can consider that it constitutes a potential new type of oncolytic immunotherapy for malignant melanoma.

LIST OF ABBREVIATIONS

IFN	=	Interferon
IFNAR	=	Interferon alpha/beta receptor 1
JAK	=	Janus kinase
MDA5	=	Melanoma differentiation-associated protein 5
MFI	=	Median fluorescence intensity
MOI	=	Multiplicity of infection
MPM	=	Malignant pleural mesothelioma
MV	=	Measles virus
MX1	=	Myxoma resistance protein 1
OV	=	Oncolytic virus
RIG-I	=	Retinoic acid-inducible gene 1 protein
Rux	=	Ruxolitinib
TCID ₅₀	=	50% Tissue Culture Infectious Dose

CONFLICT OF INTEREST

Frédéric Tangy, Jean -François Fonteneau and Marc Grégoire own patents on the use of measles virus as an oncolytic virus. Frédéric Tangy and Marc Grégoire own shares in a

startup company that develops an oncolytic measles virus for clinical use. The other authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by funding from La Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), La Ligue Contre le Cancer, l'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) and ARS Meso 44, and was realized in the context of the LabEX IGO program supported by the National Research Agency (ANR-11 -LABX -0016-01). We thank the MicroPICell imaging facility and the Flow Cytometry Facility "CytoCell" of the SFR Santé – François Bonamy for expert technical assistance.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material is available on the publisher's web site along with the published article.

REFERENCES

- [1] Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, *et al.* Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med* 2015;373(1): 23-34.
- [2] Callahan MK, Postow MA, Wolchok JD. Targeting T Cell Co-receptors for Cancer Therapy. *Immunity* 2016;44(5): 1069-78.
- [3] Chapman PB, Hauschild A, Robert C, *et al.* Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011;364(26): 2507-16.
- [4] Flaherty KT, Infante JR, Daud A, *et al.* Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med* 2012;367(18): 1694-703.
- [5] Russell SJ, Peng KW, Bell JC. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol* 2012;30(7): 658-70.
- [6] Kaufman HL, Kohlhaas FJ, Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2015;14(9): 642-62.
- [7] Andtbacka RH, Kaufman HL, Collichio F, *et al.* Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol* 2015;33(25): 2780-8.
- [8] Msaouel P, Iankov ID, Dispenzieri A, Galanis E. Attenuated oncolytic measles virus strains as cancer therapeutics. *Curr Pharm Biotechnol* 2012;13(9): 1732-41.
- [9] 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.
- [10] Russell SJ, Federspiel MJ, Peng KW, *et al.* Remission of disseminated cancer after systemic oncolytic virotherapy. *Mayo Clin Proc* 2014;89(7): 926-33.
- [11] Dorig RE, Marciel A, Chopra A, Richardson CD. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* 1993;75(2): 295-305.
- [12] Anderson BD, Nakamura T, Russell SJ, Peng KW. High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus. *Cancer Res* 2004;64(14): 4919-26.
- [13] Achard C, Boisgerault N, Delaunay T, *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.
- [14] Berchtold S, Lampe J, Weiland T, *et al.* Innate immune defense defines susceptibility of sarcoma cells to measles vaccine virus-based oncolysis. *J Virol* 2013;87(6): 3484-501.
- [15] Patel MR, Jacobson BA, Belgum H, *et al.* Measles vaccine strains for virotherapy of non-small-cell lung carcinoma. *J Thorac Oncol* 2014;9(8): 1101-10.
- [16] Parato KA, Breitbach CJ, Le Boeuf F, *et al.* The oncolytic poxvirus JX-594 selectively replicates in and destroys cancer cells driven by genetic pathways commonly activated in cancers. *Mol Ther* 2012;20(4): 749-58.
- [17] 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.
- [18] Ikegame S, Takeda M, Ohno S, Nakatsu Y, Nakanishi Y, Yanagi Y. Both RIG-I and MDA5 RNA helicases contribute to the induction of alpha/beta interferon in measles virus-infected human cells. *J Virol* 2010;84(1): 372-9.
- [19] Kato H, Takeuchi O, Sato S, *et al.* Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006;441(7089): 101-5.
- [20] Donnelly OG, Errington-Mais F, Steele L, *et al.* Measles virus causes immunogenic cell death in human melanoma. *Gene Ther* 2013;20(1): 7-15.
- [21] Combredet C, Labrousse V, Mollet L, *et al.* 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.
- [22] Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012;9(7): 676-82.
- [23] Price KL, Herlyn M, Dent CL, Gewert DR, Linge C. The prevalence of interferon-alpha transcription defects in malignant melanoma. *Melanoma Res* 2005;15(2): 91-8.
- [24] 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(12): 4882-92.
- [25] Guillaume JB, Boisgerault N, Roulois D, *et al.* Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Clin Cancer Res* 2013;19(5): 1147-58

Supplementary Material

Modulation of the Type I Interferon Response Defines the Sensitivity of Human Melanoma Cells to Oncolytic Measles Virus

Ferdaous Allagui¹, Carole Achard¹, Clarisse Panterne¹, Chantal Combredet², Nathalie Labarrière¹, Brigitte Dréno^{1,3}, Amel Benammar Elgaaied⁴, Daniel Pouliquen¹, Frédéric Tangy², Jean-François Fonteneau¹, Marc Grégoire¹ and Nicolas Boisgerault^{1,*}

¹CRCNA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France; ²CNRS-UMR3569, Unité de Gé-nomique Virale et Vaccination, Institut Pasteur, Paris, France; ³Département d'Onco-Dermatologie, Hôtel-Dieu, Nan-tes, France; ⁴Faculté des Sciences de Tunis, Université de Tunis El Manar, 1088 Tunis, Tunisie

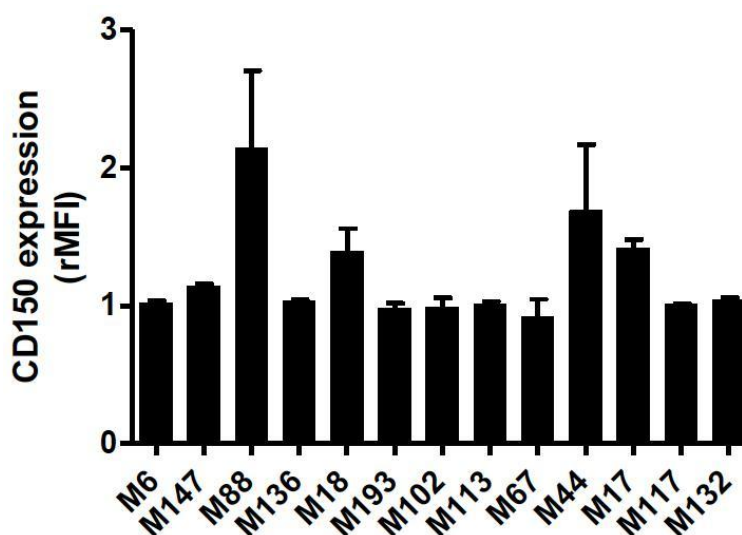


Fig. (S14): Expression of the CD150 receptor was analyzed at the surface of the melanoma cell lines by flow cytometry. Results are pre-sented as mean \pm SEM.

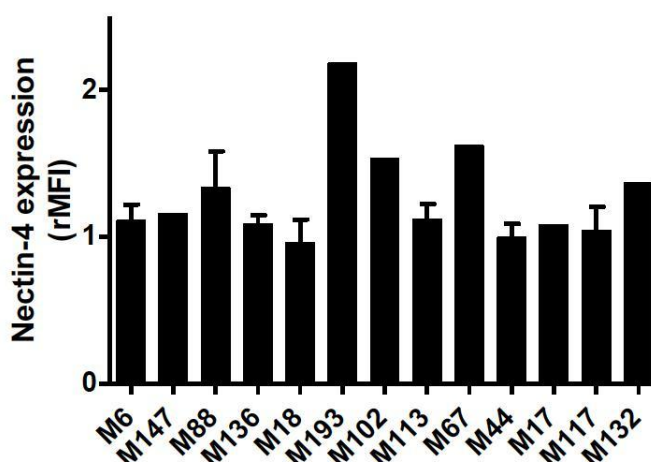


Fig. (S15): Expression of Nectin-4 receptor was analyzed at the surface of the melanoma cell lines by flow cytometry. Results are presented as mean \pm SEM.

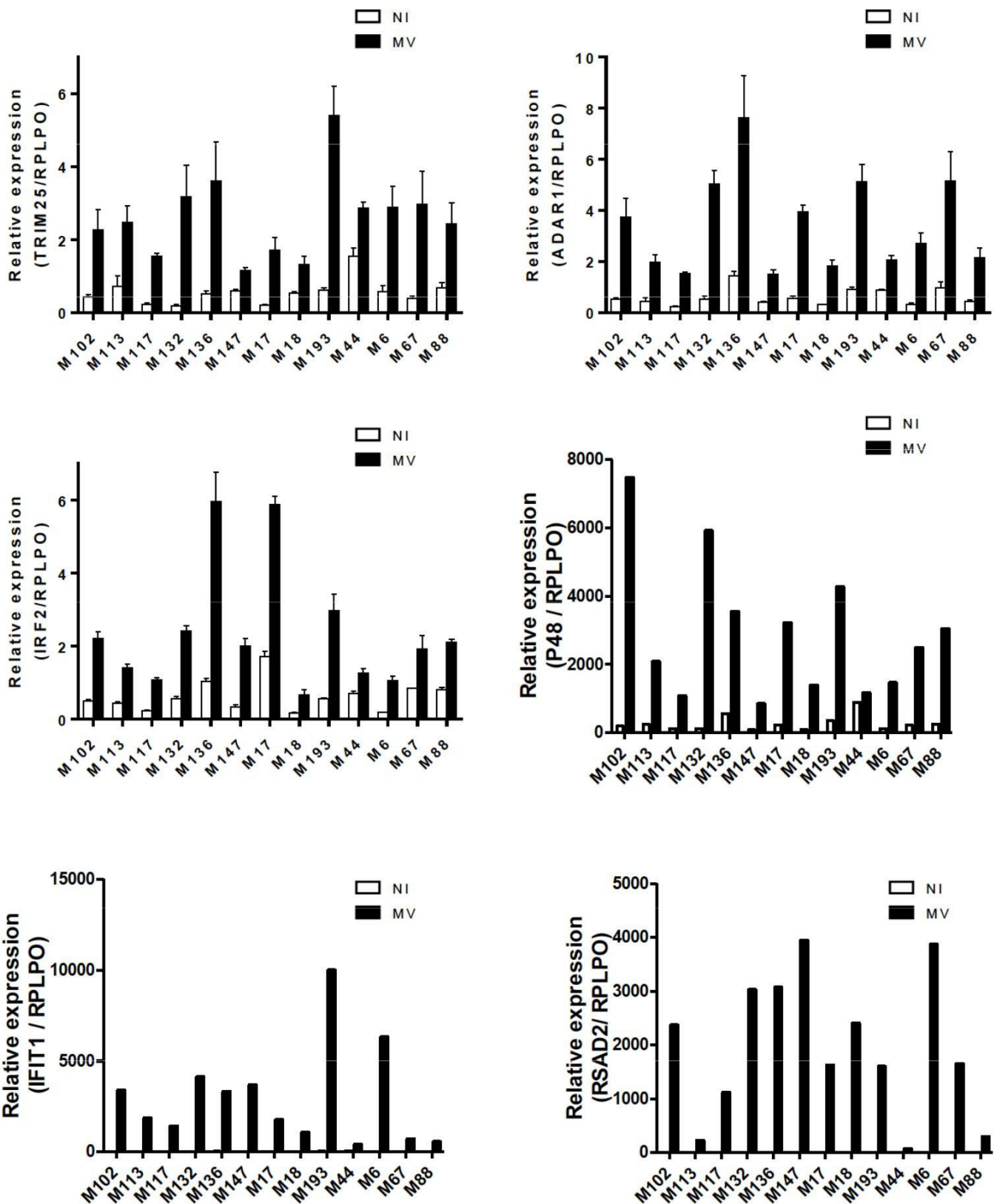


Fig. (S16). Expression of interferon stimulated genes (ISGs). Cells were either left untreated or infected with MV (MOI = 1). Relative expressions of *TRIM25*, *ADAR1*, *IRF2*, *P48*, *IFIT1* and *RSAD2* were analyzed by rt-qPCR 48h later and normalized with the housekeeping gene *RPLPO*. Results are presented as mean \pm SEM from three independent experiments.

DISCUSSION

La virothérapie anti-tumorale est une stratégie d'immunothérapie en plein essor et constitue une alternative crédible aux traitements conventionnels. Cette nouvelle stratégie de traitement des cancers consiste à utiliser des virus répliatifs atténués en tant qu'agents thérapeutiques anti-tumoraux. Cette stratégie exploite des aberrations cellulaires apparaissant lors du processus de tumorigenèse [43], [317]. Ces virus oncolytiques infectent préférentiellement les cellules tumorales de manière naturelle ou non, entraînant leur lyse sans que les tissus sains ne soient touchés [43].

Aujourd'hui, cette stratégie a prouvé son efficacité en clinique. En effet, en 2005, un adénovirus humain modifié a été approuvé par la « China Food and Drug Administration » pour le traitement des cancers de la tête et du cou, en combinaison avec une chimiothérapie [318]. De plus, la « Food and Drug Administration » américaine vient d'approuver un herpes virus oncolytique (Talimogene laherparepvec, T-Vec) en octobre 2015, pour le traitement des patients atteints de mélanomes métastatiques non opérables [38], [107]. Ces traitements thérapeutiques innovants sont le résultat de plusieurs années de recherches sur les virus oncolytiques qui ont démontré l'efficacité et l'innocuité de cette approche dans plusieurs essais cliniques [319].

Une dizaine d'essais cliniques sont en cours en Amérique du nord et en Europe. Plusieurs virus oncolytiques pourraient ainsi être approuvés prochainement pour une utilisation au niveau clinique, notamment un virus modifié de la vaccine (JX-594) pour le traitement de carcinome hépatocellulaire [320], un adénovirus codant pour la GM-CSF (CG0070) pour le cancer de vessie [321] et un réovirus pour le traitement du cancer de la tête et du cou [322].

Parmi ces virus oncolytiques, les souches atténuées du virus de la rougeole (MV) telles que Edmonston et Schwarz constituent des agents thérapeutiques prometteurs après avoir montré leur efficacité contre de nombreux types de cancers à la fois dans des modèles précliniques et dans des essais chez l'homme. Ces souches virales ont la capacité de lyser les cellules tumorales spécifiquement infectées en induisant une mort immunogène qui permet l'induction de réponses immunitaires anti-tumorales spécifiques. La souche vaccinale du MV Edmonston a ainsi été utilisée dans des essais cliniques aux Etats-Unis dans cinq types de

cancers différents [73]. Quatre essais cliniques de phase I ont été achevés et les résultats publiés sont encourageants, que les patients soient immunisés contre le virus de la rougeole [199], [234], [323] ou non [235]. Administré à de fortes doses, le MV a permis la stabilisation de cancers de l'ovaire réfractaires aux thérapies existantes chez certaines patientes après injection locale, entraînant un doublement de la médiane de survie [234], ainsi que la régression complète de myélomes multiples métastatiques après injection systémique [324].

L'équipe du Dr Marc Grégoire, au sein de laquelle j'ai effectué ma thèse, développe la stratégie de virothérapie anti-tumorale basée sur l'utilisation du virus atténué de la rougeole MV Schwarz en collaboration avec le Dr Frédéric Tangy de l'Institut Pasteur de Paris, pour le traitement de mésothéliome. La souche MV Schwarz possède naturellement la capacité à cibler plus spécifiquement les cellules tumorales que les cellules saines [317]. De plus, elle présente l'intérêt d'avoir été injectée à des millions d'enfants depuis les années 1960 sans qu'il n'ait jamais été observé une réversion vers une souche sauvage pathogène. Cette garantie, du point de vue de la sécurité d'utilisation, permet d'envisager à terme la mise en place d'un traitement chez l'humain.

Les résultats obtenus au sein de l'équipe ont démontré que la souche vaccinale du virus MV Schwarz possède des propriétés oncolytiques naturelles intéressantes contre le mésothéliome pleural malin [325] grâce à son tropisme particulier pour les cellules tumorales qui surexpriment son récepteur d'entrée CD46 [150], [326]. La protéine CD46 est une molécule inhibitrice de la cascade du complément, inactivant les composants C3b et C4b [327]. Elle est exprimée à faible niveau de façon ubiquitaire par les cellules saines. Toutefois, dans de nombreux types de cancers, une surexpression de la molécule CD46 par les cellules tumorales a été décrite [328], leur permettant d'échapper à la lyse médiée par le complément lors d'une réponse immunitaire humorale dirigée contre elles [329]. Après son entrée dans la cellule, le virus se réplique dans le cytoplasme et se propage dans les cellules voisines par la formation de syncytia (larges cellules multinucléées résultant de la fusion des cellules infectées avec les cellules voisines). Les cellules infectées meurent ensuite d'une mort cellulaire immunogène, accompagnée de la libération de signaux de danger.

La première étape de mon travail a consisté à évaluer la sensibilité au MV contre un panel de lignées de mélanome, un cancer qui fait partie des cancers d'intérêt au sein de

l'équipe puisqu'il est une cible de choix pour le développement de nouvelles thérapies. En effet, il a été décrit récemment que l'infection des cellules de mélanome par le MV pourrait induire des réponses immunogènes [330]. Cela suggère que le MV pourrait être un traitement potentiel pour le mélanome humain. Ainsi, j'ai étudié les effets oncolytiques du MV sur un grand nombre de lignées de mélanome afin d'estimer le pourcentage de patients sensibles à cette modalité thérapeutique et de déterminer quel mécanisme cellulaire pourrait être impliqué dans la sensibilité des cellules de mélanome à ce virus. Cette étude vient en complément d'une étude réalisée par l'équipe du Dr. Marc Grégoire sur un autre cancer, le mésothéliome [331].

In vitro, j'ai démontré que 10 lignées de mélanomes sur les 13 testées sont efficacement infectées et lysées par le MV. Le virus peut s'y répliquer, et y exprimer le transgène codant pour la GFP (green fluorescent protein), permettant ainsi de quantifier la réplication virale. L'infection par la souche vaccinale du virus de la rougeole provoque la formation de syncytia. En parallèle de l'étude des lignées de mélanome, il a été important de tester la sensibilité des cellules saines (mélanocytes) à l'infection par le MV, afin de valider l'innocuité du MV. Ainsi, j'ai démontré que les mélanocytes ne répliquent pas le virus MV. Une étude précédente par Donnelly et ses collègues avait décrit la sensibilité de quatre lignées de mélanome humain à une souche oncolytique du MV [330]. Cependant, ces auteurs ont signalé que les mélanocytes sains étaient également sensibles à la réplication du MV, ce qui pourrait compromettre l'utilisation du virus MV oncolytique chez les patients atteints de mélanome. Dans notre étude, nous avons constaté que les mélanocytes sains ne sont pas infectés par le MV, ce qui confirme ce qui a déjà été décrit sur les virus oncolytiques et pour le MV en particulier. En effet, les virus oncolytiques sont dans la majorité des cas incapables de se répliquer dans des cellules saines grâce à l'intégrité de leurs défenses antivirales, dont la capacité à produire de l'IFN type I.

L'étape suivante était de confirmer ces résultats *in vivo* et j'ai ainsi démontré la capacité oncolytique du MV à induire une régression tumorale massive de xéno greffes de mélanomes établis. Pour ce faire, l'équipe a développé un modèle de xéno greffe de cellules tumorales humaines de deux lignées de mélanome sensibles à l'infection par le MV et une lignée résistante, chez des souris *nude*. Notre travail a montré qu'une seule injection intra-tumorale de MV a permis de faire régresser les tumeurs issues de lignées sensibles au MV

chez les animaux traités, alors que la lignée résistante développait des tumeurs non sensibles au MV. Une analyse histologique des tissus tumoraux de la lignée M6 sensible a permis de mettre en évidence que l'effet anti-tumoral du MV *in vivo* est associé à une forte activation de la caspase-3 (apoptose) dans les tumeurs des animaux traités par rapport aux souris du groupe contrôle. Nos résultats suggèrent que l'effet oncolytique du MV est associé à l'activation des mécanismes de l'apoptose des cellules tumorales infectées.

En conclusion, ces expériences réalisées *in vitro* et *in vivo* portant sur la caractérisation de l'effet oncolytique du MV contre des lignées de mélanome, ont permis de confirmer son potentiel oncolytique dans la majorité des lignées testées. Ainsi, le MV pourrait être un excellent candidat pour le traitement de mélanome par une approche de virothérapie anti-tumorale. Cependant, si notre étude a montré que 75% des lignées de mélanomes testées sont sensibles à l'infection, 25% y demeurent résistantes. C'est pourquoi il est nécessaire de comprendre les mécanismes impliqués dans la sensibilité au MV du mélanome afin d'interpréter ces différences de sensibilité et de trouver des solutions à ces mécanismes de résistance.

La seconde partie de mon travail de thèse visait donc à expliquer les différences de sensibilité à l'infection par le MV entre les lignées de mélanome. Pour cela, afin d'élucider le mécanisme de la résistance, j'ai analysé l'expression des récepteurs d'entrée du MV sur toutes les lignées cellulaires. En effet, comme mentionné précédemment, tous les travaux précédents portant sur l'activité oncolytique du virus MV insistent sur l'importance de la molécule CD46 dans l'efficacité d'infection des cellules tumorales, compte-tenu de sa surexpression par de nombreuses cellules tumorales. Anderson *et al.* ont ainsi décrit que le pourcentage de cellules infectées lors de la première « vague d'infection » était directement proportionnelle à la densité de CD46 à la surface des cellules cibles, alors que la formation des syncytia participant à la propagation de l'infection virale nécessitait un certain seuil d'expression de CD46 [150]. De plus, les molécules CD150/SLAM et Nectin-4 utilisées comme récepteurs par la souche sauvage du virus de la rougeole peuvent être aussi impliquées dans l'infection par les souches vaccinales [136], [139].

Nos travaux ont permis de mettre en évidence que l'expression des récepteurs connus du virus de la rougeole CD46, CD150/SLAM et Nectin-4 ne permet pas d'expliquer dans tous

les cas la sensibilité des cellules tumorales de mélanome à l'infection par le MV. En effet, certaines de nos lignées de mélanome présentent une infection efficace par le virus MV malgré une très faible expression de cette molécule à leur surface comme en témoigne la forte sensibilité à l'infection de la lignée M88 qui exprime un faible niveau de la molécule CD46. Les lignées M17, M117 et M132 expriment des niveaux de CD46 comparables à la lignée M88 et ne s'infectent pourtant pas. Cependant, on n'a pu mettre en évidence l'expression de CD150/SLAM que sur une seule lignée de mélanome efficacement infectée par le virus MV. Ces résultats suggèrent donc l'implication d'autres mécanismes intracellulaires qui favoriseraient l'infection ou au contraire la rendraient plus difficile.

Compte tenu de ces résultats, j'ai donc étudié la réponse interféron de type I dans les lignées de mélanome. Ainsi, de nombreux gènes mis sous silence dans les cellules tumorales, par des modifications épigénétiques telles que la méthylation, sont ceux régulés par la signalisation des IFN de type I. En effet, les cellules tumorales de mélanomes ont souvent des défauts du mécanisme antiviral basé sur la signalisation de l'IFN de type I, favorisant ainsi la réplication de différents virus à ARN, notamment, le virus de HSV, le NDV [332] et le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) [333]. Ainsi, la sensibilité des cellules tumorales à l'IFN de type I pourrait être un des mécanismes qui influent sur l'efficacité de l'infection par le MV [154].

Dans notre étude, la réponse interféron de type I des cellules tumorales de mélanome infectées par le MV a été mesurée par quantification de l'expression des différents gènes impliqués dans les différentes étapes de la réponse IFN de type I par RT qPCR. Pour les virus à ARN comme le MV, les hélicases cytoplasmiques RIG-I et Mda5 reconnaissent l'ARN viral et induisent la production et la sécrétion d'IFN de type I, IFN- α et - β . Les IFN de type I vont alors induire de manière autocrine et paracrine l'expression de gènes stimulés par les IFN (ISG) qui vont limiter ou stopper la réplication virale, tels que Mx1, un ISG qu'on a déjà démontré son intérêt dans la sensibilité des cellules de mésothéliome à la l'infection par le MV [331].

La sensibilité des cellules tumorales humaines à l'activité oncolytique du MV a été décrite dans la littérature comme dépendante d'un seuil d'expression de CD46 à leur surface. En effet, nous montrons ici que le virus MV rentre dans toutes les cellules, indépendamment

de leur niveau d'expression de CD46, puisque nous observons une augmentation de l'expression des gènes codant pour les hélicases cytoplasmiques RIG-I et Mda5 dans toutes les cellules en présence du virus. Ensuite, nous avons démontré que deux des trois lignées résistantes à l'infection possèdent une réponse IFN de type I qui semble être intacte et peuvent ainsi contrôler la réplication du MV et résister aux effets oncolytiques du virus. Le pré-traitement de ces trois lignées avec le Ruxolitinib, un inhibiteur des kinases JAK1 et 2, qui bloque la signalisation du récepteur aux IFN de type I [334] permet ainsi de rendre les cellules sensibles à l'infection par le MV. Ceci indique que la réponse antivirale innée est intacte dans ces cellules tumorales.

A l'opposé, sept des dix lignées cellulaires sensibles ont été incapables de développer une réponse interféron de type I complète en présence du MV. Nos résultats ont montré une hétérogénéité dans les défauts de la voie interféron type I dans les lignées de mélanome. En fonction des lignées cellulaires, les défauts peuvent être trouvés en amont ou en aval de la signalisation IFNAR. Par ailleurs, suite à l'ajout d'IFN de type I (α et β) exogènes sur ces lignées sensibles, nous avons mis en évidence une réduction de la réplication du MV. Ceci suggère que les défauts de la réponse IFN de type I permettant la sensibilité des cellules tumorales de mélanome au MV peuvent intervenir à différents niveaux.

Enfin, les trois autres lignées sensibles apparaissent comme des exceptions, puisqu'elles répliquent le MV malgré leur expression des IFN de type I et de Mx1. Ces résultats suggèrent que même si Mx1 est capable d'inhiber la réplication du MV, elle n'agit pas seule et nécessite l'expression d'ISG n'étant peut-être pas exprimés dans ces trois lignées. En effet, une étude de Schoggins et ses collaborateurs, testant l'effet de plus de 350 ISG sur la réplication de 14 virus, a démontré que la protéine Mx1 inhibe fortement la réplication des virus influenza A et NDV, alors qu'elle n'inhibe pas la réplication du MV [335]. Dans ce travail, les auteurs ont démontré que la plupart des ISG ne sont pas capables d'inhiber seuls plus de 50% de l'infection par certains virus, dont le MV. Ceci suggère donc que, pour inhiber totalement la réplication virale, plusieurs ISG doivent agir de façon complémentaire. Il a en effet été décrit que l'expression de plusieurs ISG en même temps augmente l'activité antivirale observée [294]. Cependant, quand on a étudié l'expression d'autres ISGs qui ont été décrits dans la littérature à pouvoir potentiellement restreindre la réplication du MV (ADAR1,

IFIT1, IRF2, RSAD2, TRIM25 et p48), nous n'avons pas réussi à identifier un meilleur marqueur que Mx1 pour prédire la sensibilité au MV.

Très récemment, plusieurs études ont démontré que les altérations dans la signalisation de la voie IFN de type I sont essentielles pour permettre la réplication du MV dans différents types de tumeurs [154], [315], [316], [331]. Parmi celles-ci, une étude réalisée dans notre laboratoire sur des cellules de mésothéliome humains a démontré que l'infection de ces cellules par le virus oncolytique MV ne dépendait pas exclusivement de l'expression de CD46 à leur surface, mais davantage de défauts dans la réponse IFN de type I [331]. Cette étude, réalisée sur 22 lignées de mésothéliome humaines obtenues dans notre laboratoire, a démontré que la voie IFN de type I qui détermine la sensibilité ou la résistance des cellules tumorales au MV. Dans cette étude, il a été démontré que toutes les lignées de mésothéliome insensibles au MV, ainsi que les cellules saines, expriment les gènes codants pour les IFN- α et - β et sécrètent ces cytokines en réponse au MV. De plus, il a été mis en évidence la présence de la protéine antivirale Mx1 dans le cytoplasme de l'ensemble des cellules insensibles suite à l'exposition au MV, corrélant avec le profil d'expression de l'ISG codant pour cette protéine. En revanche, la majorité des lignées de MPM sensibles (11 sur 15) ne produisent pas d'IFN de type I et n'expriment pas Mx1 en réponse au MV. Cependant, ces travaux ont montré que certaines lignées (4 sur 15) développent une réponse IFN de type I qui semble être complète, caractérisée par la sécrétion des IFN- α et - β et l'expression de Mx1, et sont néanmoins sensibles à l'activité oncolytique du MV.

De la même façon d'autres études suggéraient l'implication de la réponse IFN de type I dans la sensibilité de cellules tumorales de sarcome à l'infection par la souche Schwarz du MV [154]. Sur les 8 lignées testées, 5 sont sensibles à l'infection. Les auteurs ont démontré que les 3 lignées résistantes expriment un plus faible niveau du récepteur CD46 et se sont intéressés à l'analyse de la réponse IFN de type I. En effet, ils ont démontré dans les lignées résistantes, une forte expression basale et induite par le MV, des détecteurs intracellulaires du virus RIG-I et Mda5, de l'ISG IFIT1 (Interferon-induced protein with Tetratricopeptide repeats 1) inhibant la traduction, ainsi qu'à la phosphorylation de STAT1 induite par le MV. Dans cette étude, une sécrétion d'IFN- β est mesurée pour 2 lignées résistantes sur 3, et on retrouve également certaines exceptions, à savoir une lignée sensible exprimant IFIT1 et 3 lignées sensibles sécrétant de l'IFN- β après infection par le MV. Le même groupe a étudié le phénomène de résistance au MV oncolytique de 5 lignées parmi 54 lignées provenant du

panel NCI-60 [314]. Leurs travaux ont démontré que l'altération de la réplication virale dans 4 lignées résistantes sur les 5 est due à la phosphorylation de STAT1 et à l'expression de l'ISG IFIT1. Une seule lignée résistante ne montre aucune réponse IFN de type I induite par le MV, comme la lignée sensible testée en parallèle. En complément, une autre étude démontré que, la sécrétion des IFN de type I est associée à une réduction de la sensibilité à l'effet oncolytique du MV sur les lignées d'ATL *in vitro* et *in vivo* [315]. La sécrétion d'IFN- β inhibe l'infection par le MV de 2 lignées sur les 6 testées et les lignées sensibles présentent des défauts de production d'IFN de type I et deviendraient résistantes suite à l'ajout d'IFN de type I exogènes.

L'ensemble de ces travaux soulignent l'implication de la réponse IFN type I dans le mécanisme de résistance des cellules tumorales au MV.

Dans notre étude, nous avons démontré que tous les lignées sensibles, sauf une peuvent répondre à l'ajout d'IFN de type I (α et β) exogène. En effet, les cellules de mélanome ont été décrites précédemment comme présentant une délétion d'éléments intervenant dans la signalisation des IFN de type I tels que STAT1 [336], [337] ou encore une perte homozygote d'un cluster de gènes impliqués dans cette réponse antivirales [306]. Price et ses collaborateurs ont montré que les cellules de mélanome métastatique sont généralement capables d'exprimer l'IFN- β mais ne parviennent pas à exprimer l'IFN- α en raison de leur incapacité à activer les promoteurs des différents gènes de l'IFN- α , altérant ainsi la réponse en aval du récepteur aux IFN de type I [338]. Dans notre étude, nous avons constaté que la majorité de nos lignées cellulaires présentent des défauts similaires au niveau de la production des IFN de type I. De façon intéressante, nos expériences montrent que l'ajout d'IFN de type I (α et β) exogène, entraîne la réduction de la réplication virale dans les cellules sensibles. Même si ce résultat est attendu pour les cellules incapables d'exprimer l'IFN- α , ceci suggère pour les autres lignées capables de produire de l'IFN- α qu'elles ne peuvent pas activer efficacement une réponse IFN type I complète et limiter la réplication du MV, ou même que le type d'interféron endogène produit par ces lignées cellulaires est non fonctionnel en aval du récepteur IFNAR.

Enfin, dans notre étude, nous n'avons pas constaté l'expression constitutive de Mx1 par les lignées de mélanome résistantes avant l'infection. Berchtold et ses collègues ont

rapporté une expression constitutive d'IFIT1 par les lignées de sarcome résistantes [154]. Ces données suggèrent que le niveau basal d'expression élevé de certains ISG pourrait conférer aux cellules tumorales une résistance au MV et devenir une information prédictive de la sensibilité au MV. Une étude réalisée par Evanthia Galanis sur des patients atteints d'un cancer de l'ovaire ou d'un glioblastome a démontré, grâce au séquençage à haut débit effectué sur les échantillons de tumeurs traités par le MV, que l'expression d'ISG tels qu'IFI44, IFI27, RSAD2 ainsi que Mx1 et Mx2, est négativement corrélée à la sensibilité de la tumeur à l'infection par le MV et avec le résultat clinique. Cette étude a permis d'émettre l'hypothèse qu'une forte expression basale de ces ISG pourrait être responsable de la résistance au MV de certains cancers de l'ovaire et glioblastomes, et donc pourraient être des marqueurs prédictifs de la réponse des patients à cette thérapie.

Il apparait donc nécessaire d'identifier d'autres marqueurs prédictifs de la réponse IFN type I des patients atteints de mélanome afin de prédire leur sensibilité au traitement par le virus MV oncolytique et d'augmenter son efficacité clinique.

En conclusion, nos résultats confirment le potentiel oncolytique du MV comme une option thérapeutique intéressante pour le mélanome, mais définissent également le mécanisme de résistance possible dans certaines cellules. En effet, la réponse interféron type I est la première barrière de défense innée contre les virus. Dans ce contexte, de nombreux groupes ont développé des stratégies pour atténuer la réponse immunitaire innée afin de permettre une meilleure réplication des virus oncolytiques au sein de la tumeur dans le but de mieux lyser les cellules tumorales. Par exemple, le traitement avec le cyclophosphamide (CPA), un agent utilisé à des fins chimiothérapeutiques et immunosuppresseives, combiné avec une thérapie à base d'adénovirus, ou le HSV a été prouvé pour améliorer la réplication virale dans la tumeur, et l'efficacité globale du traitement [248]. La combinaison de rapamycine avec de nombreux virus oncolytiques tels que le VSV, le virus de la myxomatose ou le HSV a également été prouvée pour favoriser la réplication virale et l'efficacité lytique du virus [339], [340]. Enfin, la co-administration avec les iHDAC (inhibiteurs des histone déacétylases), décrits pour inhiber l'immunité innée, pourrait aussi être une stratégie utile pour améliorer l'effet oncolytique et le résultat thérapeutique. En effet, les iHDAC sont des molécules utilisées en cancérologie pour réguler l'expression des gènes via des mécanismes épigénétiques. Avec leur impact profond sur la modulation de la topologie de la chromatine et la régulation de la

transcription des gènes, les iHDAC ont été démontré de pouvoir empêcher l'expression des ISGs [341]. Ainsi, il a été démontré que l'utilisation de l'acide valproïque (VPA), un iHDAC, en combinaison avec un adénovirus, favorise l'efficacité oncolytique comparé au virus seul dans des cellules tumorales de la tête et du cou *in vitro* mais aussi *in vivo*. De plus, l'utilisation d'un autre iHDAC tel que le Vorinostat (SAHA), connu pour diminuer la réponse anti-virale [341], sensibilise les cellules tumorales résistantes à l'activité oncolytique du VSV. Ce traitement a diminué le niveau d'ARN messagers codants pour l'IFN- β , Mx1 et le facteur de transcription IRF7 dans une lignée de cancer de la prostate. L'interférence des iHDAC avec la réponse d'IFN a été démontré pour améliorer la réplication virale de nombreux virus oncolytiques tels que le VSV, le virus de la vaccine et le HSV et permettre un effet synergique en induisant la mort des cellules tumorales [342]–[345].

Enfin, le Ruxolitinib, connu aussi sous le nom de Jakafi, un inhibiteur des kinases JAK1 et 2, qui bloque la signalisation du récepteur aux IFN de type I [334], a été approuvé récemment pour le traitement de syndromes myéloprolifératifs [346]. Le pré-traitement par le Ruxolitinib d'une lignée résistante de cancer de la tête et du cou *in vitro* permet ainsi une diminution de l'expression constitutive de certains ISG (IRF7 et IRF9) et de la forme phosphorylée constitutivement active de STAT1, rendant possible l'activité oncolytique du VSV [334].

Ces approches de combinaison des virus oncolytiques avec des inhibiteurs de la voie IFN de type I sont également étudiées pour le MV. Il a été ainsi mis en évidence une augmentation de la réplication du MV *in vitro* en présence du Ruxolitinib [347]. Dans ce travail de thèse, nous avons démontré que le pré-traitement de lignées de mélanome résistantes au MV avec le Ruxolitinib permet de les rendre sensibles à l'infection. De plus, une autre étude réalisée par l'équipe d'Evanthia Galanis a démontré que le traitement avec le Ruxolitinib, 48 heures avant l'infection par le MV, augmente significativement l'activité oncolytique du MV envers une lignée de glioblastome résistante. Cette étude a mis en évidence que le Ruxolitinib peut diminuer l'expression basale des ISG et empêcher leur induction en réponse au MV. L'association avec le MV est actuellement en cours d'évaluation *in vivo* dans un modèle murin.

Enfin, une autre stratégie étudiée pour inhiber la réponse interféron type I dans les cellules résistantes au MV consiste à l'utilisation de souches vaccinales du MV modifiées

pour exprimer certains gènes du virus sauvage [166]. En effet, il est reconnu que les souches atténuées du virus de la rougeole sont moins efficaces que le virus sauvage pour bloquer la réponse antivirale IFN de type I en raison des mutations survenant dans différentes protéines virales, notamment la protéine P. Ainsi, le remplacement du gène P par son homologue provenant du virus sauvage conduit à l'expression des protéines sauvages P, C et V, qui interfèrent principalement avec la transduction du signal déclenché par les IFN de type I [348]–[350], empêchant l'activation de la réponse antivirale dans des cellules de lymphome et de myélome [166]. Ce MV modifié a été démontré pour infecter plus efficacement les cellules tumorales *in vitro* ainsi que des xénogreffes de myélome multiple chez la souris par rapport à la souche vaccinale du MV. En conclusion, cette stratégie pourrait apporter un meilleur bénéfice thérapeutique. Cependant, elle pourrait être dangereuse sur les cellules saines et il sera donc nécessaire de vérifier l'effet de ce MV modifié sur les cellules saines et d'améliorer le ciblage des cellules tumorales grâce aux diverses modifications décrites auparavant, afin d'assurer la sécurité d'utilisation sur les cellules saines de ce MV modifié.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En conclusion, les résultats présentés dans cette thèse ont démontré que le virus oncolytique MV pourrait être une alternative thérapeutique pertinente pour les patients atteints de mélanome. En effet, le MV, comme d'autres virus oncolytiques, cible de manière efficace et tue les cellules de mélanome en exploitant leurs altérations génétiques. Comme il a été montré précédemment que le MV peut efficacement activer des réponses immunitaires antitumorales spécifiques, on peut considérer qu'il constitue un nouveau type d'immunothérapie oncolytique pour le mélanome malin. Cependant, d'autres études sont à envisager pour mieux comprendre cette activité oncolytique afin d'identifier les patients qui pourraient réellement bénéficier de ce traitement et ainsi optimiser son potentiel thérapeutique. En effet, un certain nombre de facteurs définissent la façon dont un patient particulier répondra à la virothérapie anti-tumorale par le MV, notamment le statut immunitaire du patient et la sensibilité de ses cellules malignes à l'infection virale. Par conséquent, il sera important de tester les cellules tumorales issues de biopsies de patients pour la présence du récepteur de virus d'une part et des défauts de la voie IFN type I d'une autre part.

Dans les essais cliniques, le MV a prouvé sa sécurité d'utilisation chez l'homme ainsi que son efficacité thérapeutique. Par conséquent, les futurs essais cliniques auront probablement davantage de succès, car les facteurs qui définissent la façon dont un patient particulier répondra à la virothérapie par le MV sont maintenant mieux compris.

Enfin, l'association de la virothérapie antitumorale par le MV avec les thérapies ciblant les « checkpoints » immunitaires CTLA-4 et PD-L1 dans le traitement du mélanome pourrait sans doute apporter un meilleur bénéfice thérapeutique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. Marks, A. P. Dorevitch, et G. Mason, « Do all melanomas come from “moles”? A study of the histological association between melanocytic naevi and melanoma », *Australas. J. Dermatol.*, vol. 31, n° 2, p. 77-80, 1990.
- [2] J. Smolle, S. Kaddu, et H. Kerl, « Non-random spatial association of melanoma and naevi--a morphometric analysis », *Melanoma Res.*, vol. 9, n° 4, p. 407-412, août 1999.
- [3] « OMS | Cancers cutanés », *WHO*. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/fr/>. [Consulté le: 03-oct-2016].
- [4] E. M. Dunki-Jacobs, G. G. Callender, et K. M. McMasters, « Current management of melanoma », *Curr. Probl. Surg.*, vol. 50, n° 8, p. 351-382, août 2013.
- [5] S. Gandini *et al.*, « Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure », *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990*, vol. 41, n° 1, p. 45-60, janv. 2005.
- [6] S. Gandini *et al.*, « Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi », *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990*, vol. 41, n° 1, p. 28-44, janv. 2005.
- [7] S. Gandini *et al.*, « Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors », *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990*, vol. 41, n° 14, p. 2040-2059, sept. 2005.
- [8] B. K. Armstrong et A. Kricke, « The epidemiology of UV induced skin cancer », *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 63, n° 1-3, p. 8-18, oct. 2001.
- [9] J. F. Thompson, R. A. Scolyer, et R. F. Kefford, « Cutaneous melanoma », *Lancet Lond. Engl.*, vol. 365, n° 9460, p. 687-701, févr. 2005.
- [10] J. D’Orazio, S. Jarrett, A. Amaro-Ortiz, et T. Scott, « UV Radiation and the Skin », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, n° 6, p. 12222-12248, juin 2013.
- [11] S. E. Filippini et A. Vega, « Breast cancer genes: beyond BRCA1 and BRCA2 », *Front. Biosci. Landmark Ed.*, vol. 18, p. 1358-1372, 2013.
- [12] C. M. Olsen, H. J. Carroll, et D. C. Whiteman, « Familial melanoma: a meta-analysis and estimates of attributable fraction », *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.*, vol. 19, n° 1, p. 65-73, janv. 2010.
- [13] W. H. Clark, D. E. Elder, D. Guerry, M. N. Epstein, M. H. Greene, et M. Van Horn, « A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma », *Hum. Pathol.*, vol. 15, n° 12, p. 1147-1165, déc. 1984.
- [14] N. Ibrahim et F. G. Haluska, « Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms », *Annu. Rev. Pathol.*, vol. 4, p. 551-579, 2009.
- [15] V. Gray-Schopfer, C. Wellbrock, et R. Marais, « Melanoma biology and new targeted therapy », *Nature*, vol. 445, n° 7130, p. 851-857, févr. 2007.
- [16] D. X. Nguyen, P. D. Bos, et J. Massagué, « Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 9, n° 4, p. 274-284, avr. 2009.
- [17] L. B. Alexandrov *et al.*, « Signatures of mutational processes in human cancer », *Nature*, vol. 500, n° 7463, p. 415-421, août 2013.
- [18] B. Vogelstein, N. Papadopoulos, V. E. Velculescu, S. Zhou, L. A. Diaz, et K. W. Kinzler, « Cancer genome landscapes », *Science*, vol. 339, n° 6127, p. 1546-1558, mars 2013.
- [19] G. Palmieri *et al.*, « Main roads to melanoma », *J. Transl. Med.*, vol. 7, p. 86, 2009.

- [20] L. A. Fecher, R. Amaravadi, et L. M. Schuchter, « Effectively targeting BRAF in melanoma: a formidable challenge », *Pigment Cell Melanoma Res.*, vol. 21, n° 4, p. 410-411, août 2008.
- [21] A. Platz, S. Egyhazi, U. Ringborg, et J. Hansson, « Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site », *Mol. Oncol.*, vol. 1, n° 4, p. 395-405, avr. 2008.
- [22] P. M. Pollock *et al.*, « High frequency of BRAF mutations in nevi », *Nat. Genet.*, vol. 33, n° 1, p. 19-20, janv. 2003.
- [23] H. Davies *et al.*, « Mutations of the BRAF gene in human cancer », *Nature*, vol. 417, n° 6892, p. 949-954, juin 2002.
- [24] T. Hocker et H. Tsao, « Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants », *Hum. Mutat.*, vol. 28, n° 6, p. 578-588, juin 2007.
- [25] P. B. Chapman *et al.*, « Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation », *N. Engl. J. Med.*, vol. 364, n° 26, p. 2507-2516, juin 2011.
- [26] F. G. Haluska, H. Tsao, H. Wu, F. S. Haluska, A. Lazar, et V. Goel, « Genetic alterations in signaling pathways in melanoma », *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 12, n° 7 Pt 2, p. 2301s-2307s, avr. 2006.
- [27] A. J. Miller et M. C. J. Mihm, « Melanoma », *N. Engl. J. Med.*, vol. 355, n° 1, p. 51-65, juill. 2006.
- [28] M. R. Zaidi, C.-P. Day, et G. Merlino, « From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 128, n° 10, p. 2381-2391, oct. 2008.
- [29] C. Garbe *et al.*, « Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline », *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990*, vol. 46, n° 2, p. 270-283, janv. 2010.
- [30] S. Bhatia, S. S. Tykodi, et J. A. Thompson, « Treatment of metastatic melanoma: an overview », *Oncol. Williston Park N*, vol. 23, n° 6, p. 488-496, mai 2009.
- [31] J. M. Kirkwood, M. H. Strawderman, M. S. Ernstoff, T. J. Smith, E. C. Borden, et R. H. Blum, « Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. », *J. Clin. Oncol.*, vol. 14, n° 1, p. 7-17, janv. 1996.
- [32] M. B. Atkins *et al.*, « Phase III trial comparing concurrent biochemotherapy with cisplatin, vinblastine, dacarbazine, interleukin-2, and interferon alfa-2b with cisplatin, vinblastine, and dacarbazine alone in patients with metastatic malignant melanoma (E3695): a trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 26, n° 35, p. 5748-5754, déc. 2008.
- [33] M. K. Khan, N. Khan, A. Almasan, et R. Macklis, « Future of radiation therapy for malignant melanoma in an era of newer, more effective biological agents », *Oncotargets Ther.*, vol. 4, p. 137-148, 2011.
- [34] A. Hong et G. Fogarty, « Role of radiation therapy in cutaneous melanoma », *Cancer J. Sudbury Mass*, vol. 18, n° 2, p. 203-207, avr. 2012.
- [35] A. Hauschild *et al.*, « Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial », *Lancet Lond. Engl.*, vol. 380, n° 9839, p. 358-365, juill. 2012.
- [36] F. S. Hodi *et al.*, « Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma », *N. Engl. J. Med.*, vol. 363, n° 8, p. 711-723, août 2010.

- [37] O. Hamid *et al.*, « Safety and Tumor Responses with Lambrolizumab (Anti-PD-1) in Melanoma », *N. Engl. J. Med.*, vol. 369, n° 2, p. 134-144, juill. 2013.
- [38] « Press Announcements - FDA approves first-of-its-kind product for the treatment of melanoma ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm469571.htm>. [Consulté le: 17-août-2016].
- [39] I. Puzanov *et al.*, « Talimogene Laherparepvec in Combination With Ipilimumab in Previously Untreated, Unresectable Stage IIIB-IV Melanoma », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 34, n° 22, p. 2619-2626, août 2016.
- [40] G. Dock, « THE INFLUENCE OF COMPLICATING DISEASES UPON LEUKAEMIA.*. », *Am. J. Med. Sci.*, vol. 127, n° 4, p. 563-592, 1904.
- [41] E. Kelly et S. J. Russell, « History of Oncolytic Viruses: Genesis to Genetic Engineering », *Mol. Ther.*, vol. 15, n° 4, p. 651-659, févr. 2007.
- [42] A. E. Moore, « Viruses with oncolytic properties and their adaptation to tumors », *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 54, n° 6, p. 945-952, juill. 1952.
- [43] S. J. Russell, K.-W. Peng, et J. C. Bell, « Oncolytic virotherapy », *Nat. Biotechnol.*, vol. 30, n° 7, p. 658-670, juill. 2012.
- [44] G. Lemay, « [Taming our enemies to make them our allies: cancer “virotherapy”] », *Médecine Sci. MS*, vol. 28, n° 4, p. 339-340, avr. 2012.
- [45] P. Msaouel, M. Opyrchal, E. Domingo Musibay, et E. Galanis, « Oncolytic measles virus strains as novel anticancer agents », *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 13, n° 4, p. 483-502, avr. 2013.
- [46] O. G. Donnelly *et al.*, « Recent clinical experience with oncolytic viruses », *Curr. Pharm. Biotechnol.*, vol. 13, n° 9, p. 1834-1841, juill. 2012.
- [47] H. L. Kaufman, F. J. Kohlhapp, et A. Zloza, « Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs », *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 14, n° 9, p. 642-662, 2015.
- [48] S. Varghese et S. D. Rabkin, « Oncolytic herpes simplex virus vectors for cancer virotherapy », *Cancer Gene Ther.*, vol. 9, n° 12, p. 967-978, déc. 2002.
- [49] B. L. Liu *et al.*, « ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties », *Gene Ther.*, vol. 10, n° 4, p. 292-303, févr. 2003.
- [50] T. Todo, R. L. Martuza, S. D. Rabkin, et P. A. Johnson, « Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, n° 11, p. 6396-6401, mai 2001.
- [51] T. Mineta, S. D. Rabkin, T. Yazaki, W. D. Hunter, et R. L. Martuza, « Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas », *Nat. Med.*, vol. 1, n° 9, p. 938-943, sept. 1995.
- [52] T. Kojaoghlanian, P. Flomenberg, et M. S. Horwitz, « The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host », *Rev. Med. Virol.*, vol. 13, n° 3, p. 155-171, juin 2003.
- [53] Y. Piao *et al.*, « Oncolytic adenovirus retargeted to Delta-EGFR induces selective antiglioma activity », *Cancer Gene Ther.*, vol. 16, n° 3, p. 256-265, mars 2009.
- [54] K. Toth, D. Dhar, et W. S. M. Wold, « Oncolytic (replication-competent) adenoviruses as anticancer agents », *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 10, n° 3, p. 353-368, mars 2010.
- [55] J. Kamizono *et al.*, « Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus exhibits cancer-specific and efficient viral replication », *Cancer Res.*, vol. 65, n° 12, p. 5284-5291, juin 2005.

- [56] D. D. Barker et A. J. Berk, « Adenovirus proteins from both E1B reading frames are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection », *Virology*, vol. 156, n° 1, p. 107-121, janv. 1987.
- [57] J. R. Bischoff *et al.*, « An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells », *Science*, vol. 274, n° 5286, p. 373-376, oct. 1996.
- [58] R. L. Chu, D. E. Post, F. R. Khuri, et E. G. Van Meir, « Use of replicating oncolytic adenoviruses in combination therapy for cancer », *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 10, n° 16, p. 5299-5312, août 2004.
- [59] G.-X. Chen, S. Zhang, X.-H. He, S.-Y. Liu, C. Ma, et X.-P. Zou, « Clinical utility of recombinant adenoviral human p53 gene therapy: current perspectives », *Oncotargets Ther.*, vol. 7, p. 1901-1909, 2014.
- [60] K. Garber, « China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment », *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 98, n° 5, p. 298-300, mars 2006.
- [61] G. C. Katsafanas et B. Moss, « Vaccinia virus intermediate stage transcription is complemented by Ras-GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein (G3BP) and cytoplasmic activation/proliferation-associated protein (p137) individually or as a heterodimer », *J. Biol. Chem.*, vol. 279, n° 50, p. 52210-52217, déc. 2004.
- [62] B.-H. Park *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.*, vol. 9, n° 6, p. 533-542, juin 2008.
- [63] J. H. Kim *et al.*, « Systemic armed oncolytic and immunologic therapy for cancer with JX-594, a targeted poxvirus expressing GM-CSF », *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, vol. 14, n° 3, p. 361-370, sept. 2006.
- [64] R. V. Dave *et al.*, « Viral warfare! Front-line defence and arming the immune system against cancer using oncolytic vaccinia and other viruses », *Surg. J. R. Coll. Surg. Edinb. Irel.*, vol. 12, n° 4, p. 210-220, août 2014.
- [65] H. S. Pandha *et al.*, « Synergistic effects of oncolytic reovirus and cisplatin chemotherapy in murine malignant melanoma », *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 15, n° 19, p. 6158-6166, oct. 2009.
- [66] R. M. Lorence, P. A. Rood, et K. W. Kelley, « Newcastle disease virus as an antineoplastic agent: induction of tumor necrosis factor-alpha and augmentation of its cytotoxicity », *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 80, n° 16, p. 1305-1312, oct. 1988.
- [67] G. N. Barber, « Vesicular stomatitis virus as an oncolytic vector », *Viral Immunol.*, vol. 17, n° 4, p. 516-527, 2004.
- [68] B. D. Lichty, A. T. Power, D. F. Stojdl, et J. C. Bell, « Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet », *Trends Mol. Med.*, vol. 10, n° 5, p. 210-216, mai 2004.
- [69] D. F. Stojdl *et al.*, « Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus », *Nat. Med.*, vol. 6, n° 7, p. 821-825, 2000.
- [70] M. M. Stanford, C. J. Breitbach, J. C. Bell, et G. McFadden, « Innate immunity, tumor microenvironment and oncolytic virus therapy: friends or foes? », *Curr. Opin. Mol. Ther.*, vol. 10, n° 1, p. 32-37, 2008.
- [71] « Oncolytic virus-mediated reversal of impaired tumor antigen presentation. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24782988>. [Consulté le: 22-avr-2016].
- [72] D. Hanahan et R. A. Weinberg, « The hallmarks of cancer », *cell*, vol. 100, n° 1, p. 57-70, 2000.
- [73] S. J. Russell, K.-W. Peng, et J. C. Bell, « Oncolytic virotherapy », *Nat. Biotechnol.*, vol. 30, n° 7, p. 658-670, 2012.

- [74] R. Auer et J. C. Bell, « Oncolytic viruses: smart therapeutics for smart cancers », *Future Oncol.*, vol. 8, n° 1, p. 1–4, 2012.
- [75] E. Lin et J. Nemunaitis, « Oncolytic viral therapies », *Cancer Gene Ther.*, vol. 11, n° 10, p. 643-664, oct. 2004.
- [76] R. E. Dörig, A. Marcil, A. Chopra, et C. D. Richardson, « The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain) », *Cell*, vol. 75, n° 2, p. 295–305, 1993.
- [77] Y. Li *et al.*, « Loss of Adenoviral Receptor Expression in Human Bladder Cancer Cells: A Potential Impact on the Efficacy of Gene Therapy », *Cancer Res.*, vol. 59, n° 2, p. 325-330, janv. 1999.
- [78] A. Hemminki, I. Dmitriev, B. Liu, R. A. Desmond, R. Alemany, et D. T. Curiel, « Targeting oncolytic adenoviral agents to the epidermal growth factor pathway with a secretory fusion molecule », *Cancer Res.*, vol. 61, n° 17, p. 6377-6381, sept. 2001.
- [79] D. M. Shayakhmetov, Z.-Y. Li, S. Ni, et A. Lieber, « Targeting of adenovirus vectors to tumor cells does not enable efficient transduction of breast cancer metastases », *Cancer Res.*, vol. 62, n° 4, p. 1063-1068, févr. 2002.
- [80] G. Zhou, G.-J. Ye, W. Debinski, et B. Roizman, « Engineered herpes simplex virus 1 is dependent on IL13Ralpha 2 receptor for cell entry and independent of glycoprotein D receptor interaction », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, n° 23, p. 15124-15129, nov. 2002.
- [81] H. Kamiyama, G. Zhou, et B. Roizman, « 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.*, vol. 13, n° 7, p. 621-629, avr. 2006.
- [82] G. Zhou et B. Roizman, « Separation of receptor-binding and profusogenic domains of glycoprotein D of herpes simplex virus 1 into distinct interacting proteins », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, n° 10, p. 4142-4146, mars 2007.
- [83] L. Menotti, A. Cerretani, H. Hengel, et G. Campadelli-Fiume, « Construction of a fully retargeted herpes simplex virus 1 recombinant capable of entering cells solely via human epidermal growth factor receptor 2 », *J. Virol.*, vol. 82, n° 20, p. 10153-10161, oct. 2008.
- [84] T. S. Miest et R. Cattaneo, « New viruses for cancer therapy: meeting clinical needs », *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 12, n° 1, p. 23- 34, janv. 2014.
- [85] T.-C. Liu et D. Kirn, « Viruses with deletions in antiapoptotic genes as potential oncolytic agents », *Oncogene*, vol. 24, n° 40, p. 6069- 6079, sept. 2005.
- [86] M. Obuchi, M. Fernandez, et G. N. Barber, « Development of recombinant vesicular stomatitis viruses that exploit defects in host defense to augment specific oncolytic activity », *J. Virol.*, vol. 77, n° 16, p. 8843- 8856, août 2003.
- [87] A. Takaoka *et al.*, « Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence », *Nature*, vol. 424, n° 6948, p. 516- 523, juill. 2003.
- [88] D. F. Stojdl *et al.*, « VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents », *Cancer Cell*, vol. 4, n° 4, p. 263- 275, oct. 2003.
- [89] S. Balachandran et G. N. Barber, « Vesicular stomatitis virus (VSV) therapy of tumors », *IUBMB Life*, vol. 50, n° 2, p. 135- 138, août 2000.
- [90] K. W. Reichard *et al.*, « Newcastle disease virus selectively kills human tumor cells », *J. Surg. Res.*, vol. 52, n° 5, p. 448- 453, mai 1992.
- [91] M. Toda, R. L. Martuza, et S. D. Rabkin, « Tumor growth inhibition by intratumoral inoculation of defective herpes simplex virus vectors expressing granulocyte-

- macrophage colony-stimulating factor », *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, vol. 2, n° 4, p. 324- 329, oct. 2000.
- [92] J. Poppers, M. Mulvey, D. Khoo, et I. Mohr, « Inhibition of PKR activation by the proline-rich RNA binding domain of the herpes simplex virus type 1 Us11 protein », *J. Virol.*, vol. 74, n° 23, p. 11215- 11221, déc. 2000.
- [93] J. E. Strong, M. C. Coffey, D. Tang, P. Sabinin, et P. W. Lee, « The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus », *EMBO J.*, vol. 17, n° 12, p. 3351- 3362, juin 1998.
- [94] K. A. Parato *et al.*, « The oncolytic poxvirus JX-594 selectively replicates in and destroys cancer cells driven by genetic pathways commonly activated in cancers », *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, vol. 20, n° 4, p. 749- 758, avr. 2012.
- [95] F. Farassati, A. D. Yang, et P. W. Lee, « Oncogenes in Ras signalling pathway dictate host-cell permissiveness to herpes simplex virus 1 », *Nat. Cell Biol.*, vol. 3, n° 8, p. 745- 750, août 2001.
- [96] J. R. Bischoff et C. E. Samuel, « Mechanism of interferon action. Activation of the human P1/eIF-2 alpha protein kinase by individual reovirus s-class mRNAs: s1 mRNA is a potent activator relative to s4 mRNA », *Virology*, vol. 172, n° 1, p. 106- 115, sept. 1989.
- [97] M. C. Coffey, J. E. Strong, P. A. Forsyth, et P. W. Lee, « Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway », *Science*, vol. 282, n° 5392, p. 1332-1334, 1998.
- [98] K. Hirasawa *et al.*, « Systemic reovirus therapy of metastatic cancer in immune-competent mice », *Cancer Res.*, vol. 63, n° 2, p. 348-353, 2003.
- [99] J. G. Sinkovics et J. C. Horvath, « Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains », *J. Clin. Virol.*, vol. 16, n° 1, p. 1-15, 2000.
- [100] H. E. Savage, R. D. Rossen, E. M. Hersh, R. S. Freedman, J. M. Bowen, et C. Plager, « Antibody development to viral and allogeneic tumor cell-associated antigens in patients with malignant melanoma and ovarian carcinoma treated with lysates of virus-infected tumor cells », *Cancer Res.*, vol. 46, n° 4 Part 2, p. 2127-2133, 1986.
- [101] W. A. Cassel et D. R. Murray, « A ten-year follow-up on stage II malignant melanoma patients treated postsurgically with Newcastle disease virus oncolysate », *Med. Oncol. Tumor Pharmacother.*, vol. 9, n° 4, p. 169-171, 1992.
- [102] M. Toda, S. D. Rabkin, H. Kojima, et R. L. Martuza, « Herpes simplex virus as an in situ cancer vaccine for the induction of specific anti-tumor immunity », *Hum. Gene Ther.*, vol. 10, n° 3, p. 385- 393, févr. 1999.
- [103] H. Fukuhara, Y. Ino, et T. Todo, « Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn », *Cancer Sci.*, vol. 107, n° 10, p. 1373- 1379, oct. 2016.
- [104] B. He, M. Gross, et B. Roizman, « The gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1alpha to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, n° 3, p. 843- 848, févr. 1997.
- [105] H. L. Kaufman, D. W. Kim, G. DeRaffele, J. Mitcham, R. S. Coffin, et S. Kim-Schulze, « Local and distant immunity induced by intralesional vaccination with an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF in patients with stage IIIc and IV melanoma », *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 17, n° 3, p. 718- 730, mars 2010.
- [106] H. L. Kaufman et S. D. Bines, « OPTIM trial: a Phase III trial of an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF for unresectable stage III or IV melanoma », *Future Oncol. Lond. Engl.*, vol. 6, n° 6, p. 941- 949, juin 2010.

- [107] R. H. I. Andtbacka *et al.*, « Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma », *J. Clin. Oncol.*, p. JCO.2014.58.3377, mai 2015.
- [108] « Survival, safety, and response patterns in a phase 1b multicenter trial of talimogene laherparepvec (T-VEC) and ipilimumab (ipi) in previously untreated, unresected stage IIIB-IV melanoma. », *J. Clin. Oncol.*
- [109] Q. He, Y. Liu, Q. Zou, et Y.-S. Guan, « Transarterial injection of H101 in combination with chemoembolization overcomes recurrent hepatocellular carcinoma », *World J. Gastroenterol. WJG*, vol. 17, n° 18, p. 2353- 2355, mai 2011.
- [110] Z.-J. Xia *et al.*, « [Phase III randomized clinical trial of intratumoral injection of E1B gene-deleted adenovirus (H101) combined with cisplatin-based chemotherapy in treating squamous cell cancer of head and neck or esophagus] », *Ai Zheng Aizheng Chin. J. Cancer*, vol. 23, n° 12, p. 1666- 1670, déc. 2004.
- [111] E. Vacchelli *et al.*, « Trial watch: Oncolytic viruses for cancer therapy », *Oncoimmunology*, vol. 2, n° 6, p. e24612, juin 2013.
- [112] R. Maitra, M. H. Ghalib, et S. Goel, « Reovirus: a targeted therapeutic--progress and potential », *Mol. Cancer Res. MCR*, vol. 10, n° 12, p. 1514- 1525, déc. 2012.
- [113] P. Lee, D. Clements, E. Helson, et S. Gujar, « Reovirus in cancer therapy: an evidence-based review », *Oncolytic Virotherapy*, p. 69, juill. 2014.
- [114] « Oncolytics Biotech® Inc. Announces First Quarter 2014 Results », *Oncolytics Biotech Inc.* [En ligne]. Disponible sur: <http://www.oncolyticsbiotech.com/news/oncolytics-biotech-inc-announces-first-quarter-2014-results/>. [Consulté le: 18-août-2016].
- [115] J. Heo *et al.*, « Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer », *Nat. Med.*, vol. 19, n° 3, p. 329- 336, mars 2013.
- [116] M. J. Mastrangelo *et al.*, « Intratumoral recombinant GM-CSF-encoding virus as gene therapy in patients with cutaneous melanoma », *Cancer Gene Ther.*, vol. 6, n° 5, p. 409- 422, oct. 1999.
- [117] S. H. Park *et al.*, « Phase 1b Trial of Biweekly Intravenous Pexa-Vec (JX-594), an Oncolytic and Immunotherapeutic Vaccinia Virus in Colorectal Cancer », *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, vol. 23, n° 9, p. 1532- 1540, sept. 2015.
- [118] « OMS | Rougeole », *WHO.* [En ligne]. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs286/fr/>. [Consulté le: 18-août-2016].
- [119] S. Delpout, R. S. Noyce, R. W. C. Siu, et C. D. Richardson, « Host factors and measles virus replication », *Curr. Opin. Virol.*, vol. 2, n° 6, p. 773- 783, déc. 2012.
- [120] S. Koethe, E. Avota, et S. Schneider-Schaulies, « Measles Virus Transmission from Dendritic Cells to T Cells: Formation of Synapse-Like Interfaces Concentrating Viral and Cellular Components », *J. Virol.*, vol. 86, n° 18, p. 9773- 9781, 2012.
- [121] L. de Witte *et al.*, « DC-SIGN and CD150 have distinct roles in transmission of measles virus from dendritic cells to T-lymphocytes », *PLoS Pathog.*, vol. 4, n° 4, p. e1000049, avr. 2008.
- [122] L. M. Esolen, B. J. Ward, T. R. Moench, et D. E. Griffin, « Infection of monocytes during measles », *J. Infect. Dis.*, vol. 168, n° 1, p. 47- 52, juill. 1993.
- [123] K. Lemon *et al.*, « Early Target Cells of Measles Virus after Aerosol Infection of Non-Human Primates », *PLOS Pathog*, vol. 7, n° 1, p. e1001263, janv. 2011.
- [124] M. Sakaguchi, Y. Yoshikawa, K. Yamanouchi, T. Sata, K. Nagashima, et K. Takeda, « Growth of measles virus in epithelial and lymphoid tissues of cynomolgus monkeys », *Microbiol. Immunol.*, vol. 30, n° 10, p. 1067- 1073, 1986.
- [125] D. E. Griffin, W.-H. Lin, et C.-H. Pan, « Measles virus, immune control, and persistence », *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 36, n° 3, p. 649- 662, mai 2012.

- [126] W. J. Moss et D. E. Griffin, « Global measles elimination », *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 4, n° 12, p. 900- 908, déc. 2006.
- [127] R. Firsching, C. J. Buchholz, U. Schneider, R. Cattaneo, V. ter Meulen, et J. Schneider-Schaulies, « Measles virus spread by cell-cell contacts: uncoupling of contact-mediated receptor (CD46) downregulation from virus uptake », *J. Virol.*, vol. 73, n° 7, p. 5265- 5273, juill. 1999.
- [128] W. J. Moss et D. E. Griffin, « Measles », *Lancet Lond. Engl.*, vol. 379, n° 9811, p. 153- 164, janv. 2012.
- [129] M. B. Borges *et al.*, « Study of the genetic stability of measles virus CAM-70 vaccine strain after serial passages in chicken embryo fibroblasts primary cultures », *Virus Genes*, vol. 36, n° 1, p. 35- 44, févr. 2008.
- [130] B. Bankamp, M. Takeda, Y. Zhang, W. Xu, et P. A. Rota, « Genetic characterization of measles vaccine strains », *J. Infect. Dis.*, vol. 204 Suppl 1, p. S533-548, juill. 2011.
- [131] C. Combredet *et al.*, « A molecularly cloned Schwarz strain of measles virus vaccine induces strong immune responses in macaques and transgenic mice », *J. Virol.*, vol. 77, n° 21, p. 11546- 11554, nov. 2003.
- [132] C. L. Parks, R. A. Lerch, P. Walpita, H. P. Wang, M. S. Sidhu, et S. A. Udem, « Comparison of predicted amino acid sequences of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage », *J. Virol.*, vol. 75, n° 2, p. 910- 920, janv. 2001.
- [133] G. A. Lund, D. L. Tyrrell, R. D. Bradley, et D. G. Scraba, « The molecular length of measles virus RNA and the structural organization of measles nucleocapsids », *J. Gen. Virol.*, vol. 65 (Pt 9), p. 1535- 1542, sept. 1984.
- [134] S. Aref, K. Bailey, et A. Fielding, « Measles to the Rescue: A Review of Oncolytic Measles Virus », *Viruses*, vol. 8, n° 10, oct. 2016.
- [135] M. Biesecker, J.-H. Kimn, H. Lu, D. Dingli, et Z. Bajzer, « Optimization of virotherapy for cancer », *Bull. Math. Biol.*, vol. 72, n° 2, p. 469- 489, févr. 2010.
- [136] H. Tatsuo, N. Ono, K. Tanaka, et Y. Yanagi, « SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus », *Nature*, vol. 406, n° 6798, p. 893- 897, août 2000.
- [137] D. Nanche *et al.*, « Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus », *J. Virol.*, vol. 67, n° 10, p. 6025- 6032, oct. 1993.
- [138] N. Dhiman, R. M. Jacobson, et G. A. Poland, « Measles virus receptors: SLAM and CD46 », *Rev. Med. Virol.*, vol. 14, n° 4, p. 217- 229, août 2004.
- [139] R. S. Noyce *et al.*, « Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus », *PLoS Pathog.*, vol. 7, n° 8, p. e1002240, août 2011.
- [140] M. D. Mühlebach *et al.*, « Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus », *Nature*, vol. 480, n° 7378, p. 530- 533, déc. 2011.
- [141] V. Lecouturier *et al.*, « Identification of two amino acids in the hemagglutinin glycoprotein of measles virus (MV) that govern hemadsorption, HeLa cell fusion, and CD46 downregulation: phenotypic markers that differentiate vaccine and wild-type MV strains », *J. Virol.*, vol. 70, n° 7, p. 4200- 4204, juill. 1996.
- [142] M. K. Liszewski, T. W. Post, et J. P. Atkinson, « Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster », *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 9, p. 431- 455, 1991.
- [143] R. Cattaneo, « Four viruses, two bacteria, and one receptor: membrane cofactor protein (CD46) as pathogens' magnet », *J. Virol.*, vol. 78, n° 9, p. 4385- 4388, mai 2004.
- [144] C. L. Mendelsohn, E. Wimmer, et V. R. Racaniello, « Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily », *Cell*, vol. 56, n° 5, p. 855- 865, mars 1989.

- [145] M. S. Derycke *et al.*, « Nectin 4 overexpression in ovarian cancer tissues and serum: potential role as a serum biomarker », *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 134, n° 5, p. 835- 845, nov. 2010.
- [146] S. Fabre-Lafay *et al.*, « Nectin-4 is a new histological and serological tumor associated marker for breast cancer », *BMC Cancer*, vol. 7, p. 73, 2007.
- [147] A. Takano *et al.*, « Identification of nectin-4 oncoprotein as a diagnostic and therapeutic target for lung cancer », *Cancer Res.*, vol. 69, n° 16, p. 6694- 6703, août 2009.
- [148] N. N. Pavlova *et al.*, « A role for PVRL4-driven cell–cell interactions in tumorigenesis », *eLife*, vol. 2, p. e00358, avr. 2013.
- [149] Z. Fishelson, N. Donin, S. Zell, S. Schultz, et M. Kirschfink, « Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors », *Mol. Immunol.*, vol. 40, n° 2- 4, p. 109- 123, sept. 2003.
- [150] B. D. Anderson, T. Nakamura, S. J. Russell, et K.-W. Peng, « High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus », *Cancer Res.*, vol. 64, n° 14, p. 4919- 4926, juill. 2004.
- [151] T. S. Miest, M. Frenzke, et R. Cattaneo, « Measles virus entry through the signaling lymphocyte activation molecule governs efficacy of mantle cell lymphoma radiovirotherapy », *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, vol. 21, n° 11, p. 2019- 2031, nov. 2013.
- [152] T. Fujiyuki *et al.*, « A measles virus selectively blind to signaling lymphocytic activation molecule shows anti-tumor activity against lung cancer cells », *Oncotarget*, vol. 6, n° 28, p. 24895- 24903, sept. 2015.
- [153] S.-C. Zhang, W.-S. Cai, Y. Zhang, K.-L. Jiang, K.-R. Zhang, et W.-L. Wang, « 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.*, vol. 325, n° 2, p. 227- 237, déc. 2012.
- [154] S. Berchtold *et al.*, « Innate immune defense defines susceptibility of sarcoma cells to measles vaccine virus-based oncolysis », *J. Virol.*, vol. 87, n° 6, p. 3484- 3501, mars 2013.
- [155] D. Grote *et al.*, « Live attenuated measles virus induces regression of human lymphoma xenografts in immunodeficient mice », *Blood*, vol. 97, n° 12, p. 3746- 3754, juin 2001.
- [156] D. Dingli *et al.*, « Image-guided radiovirotherapy for multiple myeloma using a recombinant measles virus expressing the thyroïdal sodium iodide symporter », *Blood*, vol. 103, n° 5, p. 1641- 1646, mars 2004.
- [157] A. W. Studebaker, C. R. Kreofsky, C. R. Pierson, S. J. Russell, E. Galanis, et C. Raffel, « Treatment of medulloblastoma with a modified measles virus », *Neuro-Oncol.*, p. noq057, mai 2010.
- [158] L. K. Phuong *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.*, vol. 63, n° 10, p. 2462- 2469, mai 2003.
- [159] P. Msaouel *et al.*, « Noninvasive imaging and radiovirotherapy of prostate cancer using an oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter », *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, vol. 17, n° 12, p. 2041- 2048, déc. 2009.
- [160] C. J. McDonald *et al.*, « A measles virus vaccine strain derivative as a novel oncolytic agent against breast cancer », *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 99, n° 2, p. 177- 184, sept. 2006.
- [161] K.-W. Peng *et al.*, « Pharmacokinetics of oncolytic measles virotherapy: eventual equilibrium between virus and tumor in an ovarian cancer xenograft model », *Cancer Gene Ther.*, vol. 13, n° 8, p. 732- 738, août 2006.

- [162] A. Studebaker, C. Raffel, et B. Hutzen, « Advances in the design and development of oncolytic measles viruses », *Oncolytic Virotherapy*, p. 109, août 2015.
- [163] L. M. Esolen, S. W. Park, J. M. Hardwick, et D. E. Griffin, « Apoptosis as a cause of death in measles virus-infected cells », *J. Virol.*, vol. 69, n° 6, p. 3955- 3958, juin 1995.
- [164] S. Ohno, N. Ono, M. Takeda, K. Takeuchi, et Y. Yanagi, « Dissection of measles virus V protein in relation to its ability to block alpha/beta interferon signal transduction », *J. Gen. Virol.*, vol. 85, n° Pt 10, p. 2991- 2999, oct. 2004.
- [165] B. Bankamp, M. Takeda, Y. Zhang, W. Xu, et P. A. Rota, « Genetic Characterization of Measles Vaccine Strains », *J. Infect. Dis.*, vol. 204, n° suppl 1, p. S533- S548, janv. 2011.
- [166] I. Haralambieva, I. Iankov, K. Hasegawa, M. Harvey, S. J. Russell, et K.-W. Peng, « Engineering oncolytic measles virus to circumvent the intracellular innate immune response », *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, vol. 15, n° 3, p. 588- 597, mars 2007.
- [167] S. O. Freytag, K. R. Rogulski, D. L. Paielli, J. D. Gilbert, et J. H. Kim, « A novel three-pronged approach to kill cancer cells selectively: concomitant viral, double suicide gene, and radiotherapy », *Hum. Gene Ther.*, vol. 9, n° 9, p. 1323- 1333, juin 1998.
- [168] S. O. Freytag *et al.*, « Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double suicide gene therapy for the treatment of locally recurrent prostate cancer », *Cancer Res.*, vol. 62, n° 17, p. 4968- 4976, sept. 2002.
- [169] J. Foloppe *et al.*, « Targeted delivery of a suicide gene to human colorectal tumors by a conditionally replicating vaccinia virus », *Gene Ther.*, vol. 15, n° 20, p. 1361- 1371, oct. 2008.
- [170] G. Ungerechts *et al.*, « Lymphoma chemovirotherapy: CD20-targeted and convertase-armed measles virus can synergize with fludarabine », *Cancer Res.*, vol. 67, n° 22, p. 10939- 10947, nov. 2007.
- [171] V. K. Gadi, S. D. Alexander, J. E. Kudlow, P. Allan, W. B. Parker, et E. J. Sorscher, « In vivo sensitization of ovarian tumors to chemotherapy by expression of E. coli purine nucleoside phosphorylase in a small fraction of cells », *Gene Ther.*, vol. 7, n° 20, p. 1738- 1743, oct. 2000.
- [172] J. Lampe *et al.*, « An armed oncolytic measles vaccine virus eliminates human hepatoma cells independently of apoptosis », *Gene Ther.*, vol. 20, n° 11, p. 1033- 1041, nov. 2013.
- [173] J. K. Kaufmann *et al.*, « Chemovirotherapy of Malignant Melanoma with a Targeted and Armed Oncolytic Measles Virus », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 133, n° 4, p. 1034- 1042, avr. 2013.
- [174] K. Zaoui *et al.*, « Chemovirotherapy for head and neck squamous cell carcinoma with EGFR-targeted and CD/UPRT-armed oncolytic measles virus », *Cancer Gene Ther.*, vol. 19, n° 3, p. 181- 191, mars 2012.
- [175] T. Kogai et G. A. Brent, « The sodium iodide symporter (NIS): regulation and approaches to targeting for cancer therapeutics », *Pharmacol. Ther.*, vol. 135, n° 3, p. 355- 370, sept. 2012.
- [176] G. Dai, O. Levy, et N. Carrasco, « Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter », *Nature*, vol. 379, n° 6564, p. 458- 460, févr. 1996.
- [177] K. Hasegawa, L. Pham, M. K. O'Connor, M. J. Federspiel, S. J. Russell, et K.-W. Peng, « Dual therapy of ovarian cancer using measles viruses expressing carcinoembryonic antigen and sodium iodide symporter », *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 12, n° 6, p. 1868- 1875, mars 2006.
- [178] R. M. Myers *et al.*, « Preclinical pharmacology and toxicology of intravenous MV-NIS, an oncolytic measles virus administered with or without cyclophosphamide », *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 82, n° 6, p. 700- 710, déc. 2007.

- [179] H. Li, K.-W. Peng, D. Dingli, R. A. Kratzke, et S. J. Russell, « Oncolytic measles viruses encoding interferon beta and the thyroidal sodium iodide symporter gene for mesothelioma virotherapy », *Cancer Gene Ther.*, vol. 17, n° 8, p. 550- 558, août 2010.
- [180] C. Grossardt *et al.*, « Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-armed oncolytic measles virus is an effective therapeutic cancer vaccine », *Hum. Gene Ther.*, vol. 24, n° 7, p. 644- 654, juill. 2013.
- [181] I. D. Iankov, A. R. Penheiter, S. K. Carlson, et E. Galanis, « Development of monoclonal antibody-based immunoassays for detection of Helicobacter pylori neutrophil-activating protein », *J. Immunol. Methods*, vol. 384, n° 0, p. 1- 9, oct. 2012.
- [182] A. Le Bon et D. F. Tough, « Links between innate and adaptive immunity via type I interferon », *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 14, n° 4, p. 432- 436, août 2002.
- [183] C. E. Engeland *et al.*, « CTLA-4 and PD-L1 Checkpoint Blockade Enhances Oncolytic Measles Virus Therapy », *Mol. Ther.*, vol. 22, n° 11, p. 1949- 1959, nov. 2014.
- [184] A. K. Fielding, « Measles as a potential oncolytic virus », *Rev. Med. Virol.*, vol. 15, n° 2, p. 135- 142, avr. 2005.
- [185] U. Schneider, F. Bullough, S. Vongpunsawad, S. J. Russell, et R. Cattaneo, « Recombinant measles viruses efficiently entering cells through targeted receptors », *J. Virol.*, vol. 74, n° 21, p. 9928- 9936, nov. 2000.
- [186] S. Vongpunsawad, N. Oezgun, W. Braun, et R. Cattaneo, « Selectively receptor-blind measles viruses: Identification of residues necessary for SLAM- or CD46-induced fusion and their localization on a new hemagglutinin structural model », *J. Virol.*, vol. 78, n° 1, p. 302- 313, janv. 2004.
- [187] S. Bossow *et al.*, « Armed and targeted measles virus for chemovirotherapy of pancreatic cancer », *Cancer Gene Ther.*, vol. 18, n° 8, p. 598- 608, août 2011.
- [188] C. Allen *et al.*, « Oncolytic measles virus strains in the treatment of gliomas », *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 8, n° 2, p. 213- 220, févr. 2008.
- [189] K. Friedrich *et al.*, « DARPin-targeting of Measles Virus: Unique Bispecificity, Effective Oncolysis, and Enhanced Safety », *Mol. Ther.*, vol. 21, n° 4, p. 849- 859, avr. 2013.
- [190] D. P. Bartel, « MicroRNAs: target recognition and regulatory functions », *Cell*, vol. 136, n° 2, p. 215- 233, janv. 2009.
- [191] M. Acunzo, G. Romano, D. Wernicke, et C. M. Croce, « MicroRNA and cancer--a brief overview », *Adv. Biol. Regul.*, vol. 57, p. 1- 9, janv. 2015.
- [192] J. Lu *et al.*, « MicroRNA expression profiles classify human cancers », *Nature*, vol. 435, n° 7043, p. 834- 838, juin 2005.
- [193] A. Odjélé, D. Charest, et P. Morin, « miRNAs as important drivers of glioblastomas: a no-brainer? », *Cancer Biomark. Sect. Dis. Markers*, vol. 11, n° 6, p. 245- 252, 2012.
- [194] B. Kefas *et al.*, « microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma », *Cancer Res.*, vol. 68, n° 10, p. 3566- 3572, mai 2008.
- [195] M. F. Leber *et al.*, « MicroRNA-sensitive oncolytic measles viruses for cancer-specific vector tropism », *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, vol. 19, n° 6, p. 1097- 1106, juin 2011.
- [196] R. Myers *et al.*, « Toxicology study of repeat intracerebral administration of a measles virus derivative producing carcinoembryonic antigen in rhesus macaques in support of a phase I/II clinical trial for patients with recurrent gliomas », *Hum. Gene Ther.*, vol. 19, n° 7, p. 690- 698, juill. 2008.
- [197] P. Msaouel *et al.*, « Engineered measles virus as a novel oncolytic therapy against prostate cancer », *The Prostate*, vol. 69, n° 1, p. 82- 91, janv. 2009.

- [198] C. Allen *et al.*, « Oncolytic measles virus strains have significant antitumor activity against glioma stem cells », *Gene Ther.*, vol. 20, n° 4, p. 444- 449, avr. 2013.
- [199] E. Galanis *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.*, vol. 70, n° 3, p. 875- 882, févr. 2010.
- [200] A. R. Penheiter, G. E. Griesmann, M. J. Federspiel, D. Dingli, S. J. Russell, et S. K. Carlson, « Pinhole micro-SPECT/CT for noninvasive monitoring and quantitation of oncolytic virus dispersion and percent infection in solid tumors », *Gene Ther.*, vol. 19, n° 3, p. 279- 287, mars 2012.
- [201] B. Patel *et al.*, « Differential cytopathology and kinetics of measles oncolysis in two primary B-cell malignancies provides mechanistic insights », *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, vol. 19, n° 6, p. 1034- 1040, juin 2011.
- [202] L. Heinzerling, V. Künzi, P. A. Oberholzer, T. Kündig, H. Naim, et R. Dummer, « Oncolytic measles virus in cutaneous T-cell lymphomas mounts antitumor immune responses in vivo and targets interferon-resistant tumor cells », *Blood*, vol. 106, n° 7, p. 2287- 2294, oct. 2005.
- [203] K. W. Peng, G. J. Ahmann, L. Pham, P. R. Greipp, R. Cattaneo, et S. J. Russell, « Systemic therapy of myeloma xenografts by an attenuated measles virus », *Blood*, vol. 98, n° 7, p. 2002- 2007, oct. 2001.
- [204] R. Myers *et al.*, « Oncolytic activities of approved mumps and measles vaccines for therapy of ovarian cancer », *Cancer Gene Ther.*, vol. 12, n° 7, p. 593- 599, juill. 2005.
- [205] O. G. Donnelly *et al.*, « Measles virus causes immunogenic cell death in human melanoma », *Gene Ther.*, vol. 20, n° 1, p. 7- 15, janv. 2013.
- [206] A. D. Bucheit *et al.*, « An oncolytic measles virus engineered to enter cells through the CD20 antigen », *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, vol. 7, n° 1, p. 62- 72, janv. 2003.
- [207] T. Nakamura *et al.*, « Rescue and propagation of fully retargeted oncolytic measles viruses », *Nat. Biotechnol.*, vol. 23, n° 2, p. 209- 214, févr. 2005.
- [208] K. Hasegawa, C. Hu, T. Nakamura, J. D. Marks, S. J. Russell, et K.-W. Peng, « Affinity Thresholds for Membrane Fusion Triggering by Viral Glycoproteins », *J. Virol.*, vol. 81, n° 23, p. 13149- 13157, janv. 2007.
- [209] C. Allen *et al.*, « Retargeted oncolytic measles strains entering via the EGFRvIII receptor maintain significant antitumor activity against gliomas with increased tumor specificity », *Cancer Res.*, vol. 66, n° 24, p. 11840- 11850, déc. 2006.
- [210] C. Liu, K. Hasegawa, S. J. Russell, M. Sadelain, et K.-W. Peng, « Prostate-specific membrane antigen retargeted measles virotherapy for the treatment of prostate cancer », *The Prostate*, vol. 69, n° 10, p. 1128- 1141, juill. 2009.
- [211] P. Bach *et al.*, « Specific elimination of CD133+ tumor cells with targeted oncolytic measles virus », *Cancer Res.*, vol. 73, n° 2, p. 865- 874, janv. 2013.
- [212] L. K. Hallak, J. R. Merchan, C. M. Storgard, J. C. Loftus, et S. J. Russell, « Targeted Measles Virus Vector Displaying Echistatin Infects Endothelial Cells via $\alpha\beta 3$ and Leads to Tumor Regression », *Cancer Res.*, vol. 65, n° 12, p. 5292- 5300, juin 2005.
- [213] M. D. Mühlebach *et al.*, « Liver cancer protease activity profiles support therapeutic options with matrix metalloproteinase-activatable oncolytic measles virus », *Cancer Res.*, vol. 70, n° 19, p. 7620- 7629, oct. 2010.
- [214] C. Springfield, V. von Messling, M. Frenzke, G. Ungerechts, C. J. Buchholz, et R. Cattaneo, « Oncolytic efficacy and enhanced safety of measles virus activated by tumor-secreted matrix metalloproteinases », *Cancer Res.*, vol. 66, n° 15, p. 7694- 7700, août 2006.

- [215] B. Blechacz *et al.*, « Engineered measles virus as a novel oncolytic viral therapy system for hepatocellular carcinoma », *Hepatol. Baltim. Md*, vol. 44, n° 6, p. 1465- 1477, déc. 2006.
- [216] C. Liu, S. J. Russell, et K.-W. Peng, « Systemic Therapy of Disseminated Myeloma in Passively Immunized Mice Using Measles Virus-infected Cell Carriers », *Mol. Ther.*, vol. 18, n° 6, p. 1155- 1164, juin 2010.
- [217] A. R. Penheiter *et al.*, « Sodium iodide symporter (NIS)-mediated radiovirotherapy for pancreatic cancer », *AJR Am. J. Roentgenol.*, vol. 195, n° 2, p. 341- 349, août 2010.
- [218] H. Li, K.-W. Peng, et S. J. Russell, « Oncolytic measles virus encoding thyroïdal sodium iodide symporter for squamous cell cancer of the head and neck radiovirotherapy », *Hum. Gene Ther.*, vol. 23, n° 3, p. 295- 301, mars 2012.
- [219] Y. Touchefeu *et al.*, « Optimising measles virus-guided radiovirotherapy with external beam radiotherapy and specific checkpoint kinase 1 inhibition », *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.*, vol. 108, n° 1, p. 24- 31, juill. 2013.
- [220] Y.-P. Liu *et al.*, « Oncolytic measles and vesicular stomatitis virotherapy for endometrial cancer », *Gynecol. Oncol.*, vol. 132, n° 1, p. 194- 202, janv. 2014.
- [221] V. Künzi, P. A. Oberholzer, L. Heinzerling, R. Dummer, et H. Y. Naim, « Recombinant measles virus induces cytolysis of cutaneous T-cell lymphoma in vitro and in vivo », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 126, n° 11, p. 2525- 2532, nov. 2006.
- [222] G. Ungerechts, M. E. Frenzke, K.-C. Yaiw, T. Miest, P. B. Johnston, et R. Cattaneo, « Mantle cell lymphoma salvage regimen: synergy between a reprogrammed oncolytic virus and two chemotherapeutics », *Gene Ther.*, vol. 17, n° 12, p. 1506- 1516, déc. 2010.
- [223] G. Ungerechts *et al.*, « An immunocompetent murine model for oncolysis with an armed and targeted measles virus », *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, vol. 15, n° 11, p. 1991- 1997, nov. 2007.
- [224] A. D. Hartkopf *et al.*, « Enhanced killing of ovarian carcinoma using oncolytic measles vaccine virus armed with a yeast cytosine deaminase and uracil phosphoribosyltransferase », *Gynecol. Oncol.*, vol. 130, n° 2, p. 362- 368, août 2013.
- [225] J. K. Kaufmann *et al.*, « Chemovirotherapy of malignant melanoma with a targeted and armed oncolytic measles virus », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 133, n° 4, p. 1034- 1042, avr. 2013.
- [226] S. Lange *et al.*, « A novel armed oncolytic measles vaccine virus for the treatment of cholangiocarcinoma », *Hum. Gene Ther.*, vol. 24, n° 5, p. 554- 564, mai 2013.
- [227] C. Yurttas, S. Berchtold, N. P. Malek, M. Bitzer, et U. M. Lauer, « Pulsed versus continuous application of the prodrug 5-fluorocytosine to enhance the oncolytic effectiveness of a measles vaccine virus armed with a suicide gene », *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.*, vol. 25, n° 2, p. 85- 96, juin 2014.
- [228] I. D. Iankov *et al.*, « Expression of immunomodulatory neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* enhances the antitumor activity of oncolytic measles virus », *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, vol. 20, n° 6, p. 1139- 1147, juin 2012.
- [229] C. Allen *et al.*, « Interleukin-13 Displaying Retargeted Oncolytic Measles Virus Strains Have Significant Activity Against Gliomas With Improved Specificity », *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, vol. 16, n° 9, p. 1556- 1564, sept. 2008.
- [230] A. M. Taqi, M. B. Abdurrahman, A. M. Yakubu, et A. F. Fleming, « Regression of Hodgkin's disease after measles », *Lancet Lond. Engl.*, vol. 1, n° 8229, p. 1112, mai 1981.
- [231] Z. Zygiert, « Hodgkin's disease: remissions after measles », *Lancet Lond. Engl.*, vol. 1, n° 7699, p. 593, mars 1971.

- [232] J. L. Ziegler, « Spontaneous remission in Burkitt's lymphoma », *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, vol. 44, p. 61- 65, nov. 1976.
- [233] A. Z. Bluming et J. L. Ziegler, « Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection », *Lancet Lond. Engl.*, vol. 2, n° 7715, p. 105- 106, juill. 1971.
- [234] E. Galanis *et al.*, « Oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter to treat drug-resistant ovarian cancer », *Cancer Res.*, vol. 75, n° 1, p. 22- 30, janv. 2015.
- [235] S. J. Russell *et al.*, « Remission of disseminated cancer after systemic oncolytic virotherapy », *Mayo Clin. Proc.*, vol. 89, n° 7, p. 926- 933, juill. 2014.
- [236] O. V. Matveeva, Z. S. Guo, V. M. Senin, A. V. Senina, S. A. Shabalina, et P. M. Chumakov, « Oncolysis by paramyxoviruses: preclinical and clinical studies », *Mol. Ther. Oncolytics*, vol. 2, 2015.
- [237] « MV-NIS or Investigator's Choice Chemotherapy in Treating Patients With Ovarian, Fallopian, or Peritoneal Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov ». [En ligne]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02364713>. [Consulté le: 08-nov-2016].
- [238] « Vaccine Therapy With or Without Cyclophosphamide in Treating Patients With Recurrent or Refractory Multiple Myeloma - Full Text View - ClinicalTrials.gov ». [En ligne]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00450814>. [Consulté le: 08-nov-2016].
- [239] « Viral Therapy In Treating Patients With Recurrent or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck Cancer or Metastatic Breast Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov ». [En ligne]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01846091>. [Consulté le: 08-nov-2016].
- [240] « Intrapleural Measles Virus Therapy in Patients With Malignant Pleural Mesothelioma - Full Text View - ClinicalTrials.gov ». [En ligne]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01503177>. [Consulté le: 08-nov-2016].
- [241] « Viral Therapy in Treating Patients With Recurrent Glioblastoma Multiforme - Full Text View - ClinicalTrials.gov ». [En ligne]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00390299?term=glioblastoma+measles+virus&rank=1>. [Consulté le: 08-nov-2016].
- [242] G. M. McQuillan, D. Kruszon-Moran, T. B. Hyde, B. Forghani, W. Bellini, et G. H. Dayan, « Seroprevalence of measles antibody in the US population, 1999-2004 », *J. Infect. Dis.*, vol. 196, n° 10, p. 1459- 1464, nov. 2007.
- [243] L. Hangartner, R. M. Zinkernagel, et H. Hangartner, « Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 6, n° 3, p. 231- 243, mars 2006.
- [244] S. Audet *et al.*, « Measles-Virus–Neutralizing Antibodies in Intravenous Immunoglobulins », *J. Infect. Dis.*, vol. 194, n° 6, p. 781- 789, sept. 2006.
- [245] E. K. Mader *et al.*, « Mesenchymal stem cell carriers protect oncolytic measles viruses from antibody neutralization in an orthotopic ovarian cancer therapy model », *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 15, n° 23, p. 7246- 7255, déc. 2009.
- [246] Y.-P. Liu, C. Tong, A. Dispenzieri, M. J. Federspiel, S. J. Russell, et K.-W. Peng, « Polyinosinic acid decreases sequestration and improves systemic therapy of measles virus », *Cancer Gene Ther.*, vol. 19, n° 3, p. 202- 211, mars 2012.
- [247] C. J. Breitbach *et al.*, « Targeted Inflammation During Oncolytic Virus Therapy Severely Compromises Tumor Blood Flow », *Mol. Ther.*, vol. 15, n° 9, p. 1686- 1693, juin 2007.
- [248] M. L. M. Lamfers *et al.*, « Cyclophosphamide Increases Transgene Expression Mediated by an Oncolytic Adenovirus in Glioma-Bearing Mice Monitored by

- Bioluminescence Imaging », *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, vol. 14, n° 6, p. 779, déc. 2006.
- [249] C. Willmon, K. Harrington, T. Kottke, R. Prestwich, A. Melcher, et R. Vile, « Cell carriers for oncolytic viruses: Fed Ex for cancer therapy », *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, vol. 17, n° 10, p. 1667- 1676, oct. 2009.
- [250] I. D. Iankov *et al.*, « Infected cell carriers: a new strategy for systemic delivery of oncolytic measles viruses in cancer virotherapy », *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, vol. 15, n° 1, p. 114- 122, janv. 2007.
- [251] A. Isaacs et J. Lindenmann, « Virus Interference. I. The Interferon », *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, vol. 147, n° 927, p. 258- 267, sept. 1957.
- [252] G. Weidinger, G. Henning, V. ter Meulen, et S. Niewiesk, « Inhibition of major histocompatibility complex class II-dependent antigen presentation by neutralization of gamma interferon leads to breakdown of resistance against measles virus-induced encephalitis », *J. Virol.*, vol. 75, n° 7, p. 3059- 3065, avr. 2001.
- [253] S. Jensen et A. R. Thomsen, « Sensing of RNA Viruses: a Review of Innate Immune Receptors Involved in Recognizing RNA Virus Invasion », *J. Virol.*, vol. 86, n° 6, p. 2900- 2910, mars 2012.
- [254] J. Melchjorsen, « Learning from the Messengers: Innate Sensing of Viruses and Cytokine Regulation of Immunity — Clues for Treatments and Vaccines », *Viruses*, vol. 5, n° 2, p. 470- 527, janv. 2013.
- [255] O. Takeuchi et S. Akira, « Pattern recognition receptors and inflammation », *Cell*, vol. 140, n° 6, p. 805- 820, mars 2010.
- [256] L. A. J. O'Neill et A. G. Bowie, « Sensing and signaling in antiviral innate immunity », *Curr. Biol. CB*, vol. 20, n° 7, p. R328-333, avr. 2010.
- [257] S. S. Diebold, T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira, et C. Reis e Sousa, « Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA », *Science*, vol. 303, n° 5663, p. 1529- 1531, mars 2004.
- [258] F. Heil *et al.*, « Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8 », *Science*, vol. 303, n° 5663, p. 1526- 1529, mars 2004.
- [259] K. Onoguchi, M. Yoneyama, et T. Fujita, « Retinoic acid-inducible gene-I-like receptors », *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.*, vol. 31, n° 1, p. 27- 31, janv. 2011.
- [260] P. Ranjan, J. B. Bowzard, J. W. Schwerzmann, V. Jeisy-Scott, T. Fujita, et S. Sambhara, « Cytoplasmic nucleic acid sensors in antiviral immunity », *Trends Mol. Med.*, vol. 15, n° 8, p. 359- 368, août 2009.
- [261] C. Wilkins et M. Gale, « Recognition of viruses by cytoplasmic sensors », *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 22, n° 1, p. 41- 47, févr. 2010.
- [262] K. Childs, R. Randall, et S. Goodbourn, « Paramyxovirus V Proteins Interact with the RNA Helicase LGP2 To Inhibit RIG-I-Dependent Interferon Induction », *J. Virol.*, vol. 86, n° 7, p. 3411- 3421, janv. 2012.
- [263] A. Murali *et al.*, « Structure and function of LGP2, a DEX(D/H) helicase that regulates the innate immunity response », *J. Biol. Chem.*, vol. 283, n° 23, p. 15825- 15833, juin 2008.
- [264] M. Yoneyama *et al.*, « Shared and unique functions of the DEXD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 175, n° 5, p. 2851- 2858, sept. 2005.
- [265] T. Saito *et al.*, « Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2 », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, n° 2, p. 582- 587, janv. 2007.

- [266] E. Dixit *et al.*, « Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity », *Cell*, vol. 141, n° 4, p. 668- 681, mai 2010.
- [267] M. Yoneyama et T. Fujita, « RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors », *Immunol. Rev.*, vol. 227, n° 1, p. 54- 65, janv. 2009.
- [268] D. W. Leung et G. K. Amarasinghe, « Structural insights into RNA recognition and activation of RIG-I-like receptors », *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 22, n° 3, p. 297- 303, juin 2012.
- [269] D. Gerlier et D. S. Lyles, « Interplay between innate immunity and negative-strand RNA viruses: towards a rational model », *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR*, vol. 75, n° 3, p. 468- 490, second page of table of contents, sept. 2011.
- [270] M. Schlee et G. Hartmann, « The chase for the RIG-I ligand--recent advances », *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, vol. 18, n° 7, p. 1254- 1262, juill. 2010.
- [271] M. Schlee *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*, vol. 31, n° 1, p. 25- 34, juill. 2009.
- [272] S. Plumet, F. Herschke, J.-M. Bourhis, H. Valentin, S. Longhi, et D. Gerlier, « Cytosolic 5'-triphosphate ended viral leader transcript of measles virus as activator of the RIG I-mediated interferon response », *PloS One*, vol. 2, n° 3, p. e279, 2007.
- [273] H. Kato *et al.*, « Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5 », *J. Exp. Med.*, vol. 205, n° 7, p. 1601- 1610, juill. 2008.
- [274] H. Kato *et al.*, « Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses », *Nature*, vol. 441, n° 7089, p. 101- 105, mai 2006.
- [275] S. Ikegame, M. Takeda, S. Ohno, Y. Nakatsu, Y. Nakanishi, et Y. Yanagi, « Both RIG-I and MDA5 RNA Helicases Contribute to the Induction of Alpha/Beta Interferon in Measles Virus-Infected Human Cells », *J. Virol.*, vol. 84, n° 1, p. 372- 379, janv. 2010.
- [276] H. Berghäll *et al.*, « The interferon-inducible RNA helicase, mda-5, is involved in measles virus-induced expression of antiviral cytokines », *Microbes Infect. Inst. Pasteur*, vol. 8, n° 8, p. 2138- 2144, juill. 2006.
- [277] D. Vitour *et al.*, « Polo-like kinase 1 (PLK1) regulates interferon (IFN) induction by MAVS », *J. Biol. Chem.*, vol. 284, n° 33, p. 21797- 21809, août 2009.
- [278] K. Honda, A. Takaoka, et T. Taniguchi, « Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors », *Immunity*, vol. 25, n° 3, p. 349- 360, sept. 2006.
- [279] W. M. Schneider, M. D. Chevillotte, et C. M. Rice, « Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses », *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 32, p. 513- 545, 2014.
- [280] M. J. de Veer *et al.*, « Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays », *J. Leukoc. Biol.*, vol. 69, n° 6, p. 912- 920, juin 2001.
- [281] J. Verhelst, E. Parthoens, B. Schepens, W. Fiers, et X. Saelens, « Interferon-inducible protein Mx1 inhibits influenza virus by interfering with functional viral ribonucleoprotein complex assembly », *J. Virol.*, vol. 86, n° 24, p. 13445- 13455, déc. 2012.
- [282] G. Kochs et O. Haller, « GTP-bound human MxA protein interacts with the nucleocapsids of Thogoto virus (Orthomyxoviridae) », *J. Biol. Chem.*, vol. 274, n° 7, p. 4370- 4376, févr. 1999.
- [283] S. Gao *et al.*, « Structural basis of oligomerization in the stalk region of dynamin-like MxA », *Nature*, vol. 465, n° 7297, p. 502- 506, mai 2010.
- [284] S. Gao *et al.*, « Structure of myxovirus resistance protein a reveals intra- and intermolecular domain interactions required for the antiviral function », *Immunity*, vol. 35, n° 4, p. 514- 525, oct. 2011.

- [285] J. Verhelst, P. Hulpiau, et X. Saelens, « Mx Proteins: Antiviral Gatekeepers That Restrain the Uninvited », *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 77, n° 4, p. 551- 566, janv. 2013.
- [286] O. Daumke, S. Gao, A. von der Malsburg, O. Haller, et G. Kochs, « Structure of the MxA stalk elucidates the assembly of ring-like units of an antiviral module », *Small GTPases*, vol. 1, n° 1, p. 62- 64, juill. 2010.
- [287] H. Xiao, M. J. Killip, P. Staeheli, R. E. Randall, et D. Jackson, « The Human Interferon-Induced MxA Protein Inhibits Early Stages of Influenza A Virus Infection by Retaining the Incoming Viral Genome in the Cytoplasm », *J. Virol.*, vol. 87, n° 23, p. 13053- 13058, déc. 2013.
- [288] O. Haller, P. Staeheli, M. Schwemmle, et G. Kochs, « Mx GTPases: dynamin-like antiviral machines of innate immunity », *Trends Microbiol.*, vol. 23, n° 3, p. 154- 163, mars 2015.
- [289] J. J. Schnorr, S. Schneider-Schaulies, A. Simon-Jödicke, J. Pavlovic, M. A. Horisberger, et V. ter Meulen, « MxA-dependent inhibition of measles virus glycoprotein synthesis in a stably transfected human monocytic cell line », *J. Virol.*, vol. 67, n° 8, p. 4760- 4768, août 1993.
- [290] S. Schneider-Schaulies, J. Schneider-Schaulies, A. Schuster, M. Bayer, J. Pavlovic, et V. ter Meulen, « Cell type-specific MxA-mediated inhibition of measles virus transcription in human brain cells », *J. Virol.*, vol. 68, n° 11, p. 6910- 6917, nov. 1994.
- [291] S. Balachandran et G. N. Barber, « PKR in innate immunity, cancer, and viral oncolysis », *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 383, p. 277- 301, 2007.
- [292] R. Suspène *et al.*, « Double-stranded RNA adenosine deaminase ADAR-1-induced hypermutated genomes among inactivated seasonal influenza and live attenuated measles virus vaccines », *J. Virol.*, vol. 85, n° 5, p. 2458- 2462, mars 2011.
- [293] A. M. Toth, Z. Li, R. Cattaneo, et C. E. Samuel, « RNA-specific Adenosine Deaminase ADAR1 Suppresses Measles Virus-induced Apoptosis and Activation of Protein Kinase PKR », *J. Biol. Chem.*, vol. 284, n° 43, p. 29350- 29356, oct. 2009.
- [294] J. W. Schoggins *et al.*, « A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response », *Nature*, vol. 472, n° 7344, p. 481- 485, avr. 2011.
- [295] J. W. Schoggins, « Interferon-stimulated genes: roles in viral pathogenesis », *Curr. Opin. Virol.*, vol. 6, p. 40- 46, juin 2014.
- [296] J. Andrejeva *et al.*, « 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.*, vol. 101, n° 49, p. 17264- 17269, déc. 2004.
- [297] H. Palosaari, J.-P. Parisien, J. J. Rodriguez, C. M. Ulane, et C. M. Horvath, « STAT Protein Interference and Suppression of Cytokine Signal Transduction by Measles Virus V Protein », *J. Virol.*, vol. 77, n° 13, p. 7635- 7644, janv. 2003.
- [298] S. Yokota, H. Saito, T. Kubota, N. Yokosawa, K. Amano, et N. Fujii, « Measles virus suppresses interferon-alpha signaling pathway: suppression of Jak1 phosphorylation and association of viral accessory proteins, C and V, with interferon-alpha receptor complex », *Virology*, vol. 306, n° 1, p. 135- 146, févr. 2003.
- [299] M. Shingai *et al.*, « Differential type I IFN-inducing abilities of wild-type versus vaccine strains of measles virus », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 179, n° 9, p. 6123- 6133, nov. 2007.
- [300] G. R. Stark, I. M. Kerr, B. R. Williams, R. H. Silverman, et R. D. Schreiber, « How cells respond to interferons », *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 67, p. 227- 264, 1998.
- [301] C. Constantinou *et al.*, « p53-induced inhibition of protein synthesis is independent of apoptosis », *Eur. J. Biochem.*, vol. 270, n° 15, p. 3122- 3132, août 2003.

- [302] T. S. Lin, S. Mahajan, et D. A. Frank, « STAT signaling in the pathogenesis and treatment of leukemias », *Oncogene*, vol. 19, n° 21, p. 2496- 2504, mai 2000.
- [303] M. Sahni, R. Raz, J. D. Coffin, D. Levy, et C. Basilico, « STAT1 mediates the increased apoptosis and reduced chondrocyte proliferation in mice overexpressing FGF2 », *Dev. Camb. Engl.*, vol. 128, n° 11, p. 2119- 2129, juin 2001.
- [304] N. N. Khodarev *et al.*, « STAT1 Pathway Mediates Amplification of Metastatic Potential and Resistance to Therapy », *PLOS ONE*, vol. 4, n° 6, p. e5821, juin 2009.
- [305] W. M. Lydiatt, B. J. Davidson, S. P. Schantz, S. Caruana, et R. S. Chaganti, « 9p21 deletion correlates with recurrence in head and neck cancer », *Head Neck*, vol. 20, n° 2, p. 113- 118, mars 1998.
- [306] P. S. Linsley, C. Speake, E. Whalen, et D. Chaussabel, « Copy number loss of the interferon gene cluster in melanomas is linked to reduced T cell infiltrate and poor patient prognosis », *PloS One*, vol. 9, n° 10, p. e109760, 2014.
- [307] J. Gong et M. M. Mita, « Activated Ras Signaling Pathways and Reovirus Oncolysis: An Update on the Mechanism of Preferential Reovirus Replication in Cancer Cells », *Front. Oncol.*, vol. 4, juin 2014.
- [308] L. S. Belkowsky et G. C. Sen, « Inhibition of vesicular stomatitis viral mRNA synthesis by interferons. », *J. Virol.*, vol. 61, n° 3, p. 653–660, 1987.
- [309] M. R. Patel *et al.*, « Vesicular stomatitis virus expressing interferon- β is oncolytic and promotes antitumor immune responses in a syngeneic murine model of non-small cell lung cancer », *Oncotarget*, vol. 6, n° 32, p. 33165- 33177, oct. 2015.
- [310] V. V. S. Kurisetty *et al.*, « Preclinical safety and activity of recombinant VSV-IFN- β in an immunocompetent model of squamous cell carcinoma of the head and neck », *Head Neck*, vol. 36, n° 11, p. 1619- 1627, nov. 2014.
- [311] C. L. Willmon *et al.*, « Expression of IFN-beta enhances both efficacy and safety of oncolytic vesicular stomatitis virus for therapy of mesothelioma », *Cancer Res.*, vol. 69, n° 19, p. 7713- 7720, oct. 2009.
- [312] A. U. Blackham *et al.*, « Molecular determinants of susceptibility to oncolytic vesicular stomatitis virus in pancreatic adenocarcinoma », *J. Surg. Res.*, vol. 187, n° 2, p. 412- 426, avr. 2014.
- [313] M. Moerdyk-Schauwecker, N. R. Shah, A. M. Murphy, E. Hastie, P. Mukherjee, et V. Z. Grzelishvili, « Resistance of pancreatic cancer cells to oncolytic vesicular stomatitis virus: role of type I interferon signaling », *Virology*, vol. 436, n° 1, p. 221- 234, févr. 2013.
- [314] M. Noll, S. Berchtold, J. Lampe, N. P. Malek, M. Bitzer, et U. M. Lauer, « Primary resistance phenomena to oncolytic measles vaccine viruses », *Int. J. Oncol.*, vol. 43, n° 1, p. 103- 112, juill. 2013.
- [315] M. C. M Parrula, S. A. Fernandez, K. Landes, D. Huey, M. Lairmore, et S. Niewiesk, « Success of measles virotherapy in ATL depends on type I interferon secretion and responsiveness », *Virus Res.*, vol. 189, p. 206- 213, août 2014.
- [316] M. R. Patel *et al.*, « Measles vaccine strains for virotherapy of non-small-cell lung carcinoma », *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer*, vol. 9, n° 8, p. 1101- 1110, août 2014.
- [317] K. A. Parato, D. Senger, P. A. J. Forsyth, et J. C. Bell, « Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 5, n° 12, p. 965- 976, déc. 2005.
- [318] D. Y. Sze, T. R. Reid, et S. C. Rose, « Oncolytic Virotherapy », *J. Vasc. Interv. Radiol.*, vol. 24, n° 8, p. 1115- 1122, août 2013.
- [319] M. G. Bourke *et al.*, « The emerging role of viruses in the treatment of solid tumours », *Cancer Treat. Rev.*, vol. 37, n° 8, p. 618- 632, déc. 2011.

- [320] C. J. Breitbach, A. Moon, J. Burke, T.-H. Hwang, et D. H. Kirn, « A Phase 2, Open-Label, Randomized Study of Pexa-Vec (JX-594) Administered by Intratumoral Injection in Patients with Unresectable Primary Hepatocellular Carcinoma », *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 1317, p. 343- 357, 2015.
- [321] J. M. Burke *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.*, vol. 188, n° 6, p. 2391- 2397, déc. 2012.
- [322] T. Cooper *et al.*, « Oncolytic activity of reovirus in HPV positive and negative head and neck squamous cell carcinoma », *J. Otolaryngol. - Head Neck Surg. J. Oto-Rhino-Laryngol. Chir. Cervico-Faciale*, vol. 44, p. 8, févr. 2015.
- [323] L. Heinzerling, V. Künzi, P. A. Oberholzer, T. Kündig, H. Naim, et R. Dummer, « Oncolytic measles virus in cutaneous T-cell lymphomas mounts antitumor immune responses in vivo and targets interferon-resistant tumor cells », *Blood*, vol. 106, n° 7, p. 2287- 2294, oct. 2005.
- [324] S. J. Russell *et al.*, « Remission of disseminated cancer after systemic oncolytic virotherapy », *Mayo Clin. Proc.*, vol. 89, n° 7, p. 926- 933, juill. 2014.
- [325] J.-B. Guillerme, M. Gregoire, F. Tangy, et J.-F. Fonteneau, « Antitumor Virotherapy by Attenuated Measles Virus (MV) », *Biology*, vol. 2, n° 2, p. 587- 602, mars 2013.
- [326] P. Msaouel, I. D. Iankov, A. Dispenzieri, et E. Galanis, « Attenuated oncolytic Measles Virus strains as cancer therapeutics », *Curr. Pharm. Biotechnol.*, vol. 13, n° 9, p. 1732- 1741, juill. 2012.
- [327] E. M. Adams, M. C. Brown, M. Nunge, M. Krych, et J. P. Atkinson, « Contribution of the repeating domains of membrane cofactor protein (CD46) of the complement system to ligand binding and cofactor activity. », *J. Immunol.*, vol. 147, n° 9, p. 3005- 3011, janv. 1991.
- [328] Z. Fishelson, N. Donin, S. Zell, S. Schultz, et M. Kirschfink, « Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors », *Mol. Immunol.*, vol. 40, n° 2- 4, p. 109- 123, sept. 2003.
- [329] D. Gancz et Z. Fishelson, « Cancer resistance to complement-dependent cytotoxicity (CDC): Problem-oriented research and development », *Mol. Immunol.*, vol. 46, n° 14, p. 2794- 2800, sept. 2009.
- [330] O. G. Donnelly *et al.*, « Measles virus causes immunogenic cell death in human melanoma », *Gene Ther.*, vol. 20, n° 1, p. 7- 15, janv. 2013.
- [331] C. Achard *et al.*, « Sensitivity of human pleural mesothelioma to oncolytic measles virus depends on defects of the type I interferon response », *Oncotarget*, nov. 2015.
- [332] H. Wilden, P. Fournier, R. Zawatzky, et V. Schirmmayer, « Expression of RIG-I, IRF3, IFN-beta and IRF7 determines resistance or susceptibility of cells to infection by Newcastle Disease Virus », *Int. J. Oncol.*, vol. 34, n° 4, p. 971- 982, avr. 2009.
- [333] D. F. Stojdl *et al.*, « Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus », *Nat. Med.*, vol. 6, n° 7, p. 821- 825, juill. 2000.
- [334] D. Escobar-Zarate, Y.-P. Liu, L. Suksanpaisan, S. Russell, et K.-W. Peng, « Overcoming cancer cell resistance to VSV oncolysis with JAK1/2 inhibitors », *Cancer Gene Ther.*, vol. 20, n° 10, p. 582- 589, oct. 2013.
- [335] J. W. Schoggins *et al.*, « Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity », *Nature*, vol. 505, n° 7485, p. 691- 695, janv. 2014.
- [336] W. H. Sun *et al.*, « Interferon- α Resistance in a Cutaneous T-Cell Lymphoma Cell Line Is Associated With Lack of STAT1 Expression », *Blood*, vol. 91, n° 2, p. 570- 576, janv. 1998.

- [337] L. H. Wong *et al.*, « Interferon-resistant Human Melanoma Cells Are Deficient in ISGF3 Components, STAT1, STAT2, and p48-ISGF3 γ », *J. Biol. Chem.*, vol. 272, n^o 45, p. 28779- 28785, juill. 1997.
- [338] K. L. Price, M. Herlyn, C. L. Dent, D. R. Gewert, et C. Linge, « The prevalence of interferon-alpha transcription defects in malignant melanoma », *Melanoma Res.*, vol. 15, n^o 2, p. 91- 98, avr. 2005.
- [339] J. Li, S. G. Kim, et J. Blenis, « Rapamycin: one drug, many effects », *Cell Metab.*, vol. 19, n^o 3, p. 373- 379, mars 2014.
- [340] « Efficacy and safety/toxicity study of recombinant vaccinia virus JX-594 in two immunocompetent... - Abstract - Europe PMC ». [En ligne]. Disponible sur: <http://europepmc.org/abstract/med/20808290>. [Consulté le: 28-oct-2016].
- [341] H.-M. Chang *et al.*, « Induction of interferon-stimulated gene expression and antiviral responses require protein deacetylase activity », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, n^o 26, p. 9578- 9583, juin 2004.
- [342] J. J. Cody, J. M. Markert, et D. R. Hurst, « Histone Deacetylase Inhibitors Improve the Replication of Oncolytic Herpes Simplex Virus in Breast Cancer Cells », *PLoS ONE*, vol. 9, n^o 3, mars 2014.
- [343] A. Otsuki *et al.*, « Histone Deacetylase Inhibitors Augment Antitumor Efficacy of Herpes-based Oncolytic Viruses », *Mol. Ther.*, vol. 16, n^o 9, p. 1546- 1555, juill. 2008.
- [344] T. L.-A. Nguyen *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.*, vol. 105, n^o 39, p. 14981- 14986, sept. 2008.
- [345] H. MacTavish *et al.*, « Enhancement of vaccinia virus based oncolysis with histone deacetylase inhibitors », *PloS One*, vol. 5, n^o 12, p. e14462, déc. 2010.
- [346] J. Mascarenhas et R. Hoffman, « Ruxolitinib: the first FDA approved therapy for the treatment of myelofibrosis », *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 18, n^o 11, p. 3008- 3014, juin 2012.
- [347] C. E. Stewart, R. E. Randall, et C. S. Adamson, « Inhibitors of the Interferon Response Enhance Virus Replication In Vitro », *PLoS ONE*, vol. 9, n^o 11, nov. 2014.
- [348] P. Devaux, V. von Messling, W. Songsunthong, C. Springfield, et R. Cattaneo, « Tyrosine 110 in the measles virus phosphoprotein is required to block STAT1 phosphorylation », *Virology*, vol. 360, n^o 1, p. 72- 83, mars 2007.
- [349] G. Caignard *et al.*, « Measles virus V protein blocks Jak1-mediated phosphorylation of STAT1 to escape IFN- α/β signaling », *Virology*, vol. 368, n^o 2, p. 351- 362, nov. 2007.
- [350] J. A. Shaffer, W. J. Bellini, et P. A. Rota, « The C protein of measles virus inhibits the type I interferon response », *Virology*, vol. 315, n^o 2, p. 389- 397, oct. 2003.

Thèse de Doctorat

Ferdaous ALLAGUI

Utilisation du vaccin de la rougeole dans le traitement des cancers résistants aux traitements usuels : modèle du mélanome

Uses of measles vaccine for treatment of cancers resistant to conventional treatments: the melanoma model

Résumé

Le mélanome métastatique reste à l'heure actuelle une pathologie agressive avec une survie moyenne de 13 mois après le diagnostic quelque soit le traitement. C'est pourquoi, la virothérapie anti-tumorale apparait comme une stratégie thérapeutique alternative. Le virus atténué de la rougeole (MV) est un candidat intéressant dans le cadre de cette stratégie. Mes travaux de thèse explorent l'utilisation du virus MV comme nouvelle stratégie de traitement du mélanome. Dans un premier temps, j'ai analysé l'effet oncolytique du MV *in vitro* contre un panel de lignées cellulaires de mélanome établies dans notre laboratoire. Ces lignées cellulaires présentent des niveaux variables de sensibilité à l'infection par le MV. Nous avons montré *in vitro* que cette sensibilité à l'infection ne peut pas être corrélée à l'expression du récepteur d'entrée spécifique du MV dans les cellules. *In vivo*, dans des modèles de xéno greffes de tumeurs humaines chez des souris immunodéficientes, le traitement par le MV induit des régressions tumorales importantes uniquement pour les lignées cellulaires sensibles à l'infection. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'étude de la réponse anti-virale IFN de type I en réponse au MV, afin d'expliquer ces différences de sensibilité. Nous avons ainsi démontré que le traitement de cellules sensibles au MV par des IFN de type I permet de bloquer leur infection. A l'inverse, l'utilisation du Ruxolitinib, un inhibiteur de la signalisation de la voie IFN de type I, sur les lignées résistantes, permet de rendre celles-ci sensibles à l'infection. Ces résultats confirment le potentiel oncolytique du MV contre les cellules tumorales de mélanome et suggèrent aussi que la sensibilité des cellules de mélanome au virus MV est dépendante à la fois du niveau d'expression de CD46 et des défauts de la voie IFN de type I.

Mots clés

Mélanome – virus oncolytiques - virus de la rougeole - virothérapie anti-tumorale - interféron de type I – Ruxolitinib.

Abstract

Metastatic melanoma represents the most aggressive form of skin cancer with a median survival around 13 months. Thus, antitumor virotherapy appears as a potential therapeutic alternative. Live-attenuated measles virus (MV) is a good candidate for this strategy. In this work, we explored the use of MV as a new melanoma treatment strategy. In a first part, we analyzed the oncolytic effect of MV against a panel of human melanoma cell lines established in our laboratory. These cell lines exhibited varying levels of sensitivity to MV infection that cannot be fully explained by their level of expression of CD46 receptor at their surface. In melanoma xenograft mouse models, MV treatment induced important tumor regressions for sensitive cell lines but other were completely insensitive resulting in rapid tumor growth. In a second study, we analyzed the type I IFN response in our panel of melanoma cells to explain these differences in sensitivity. We have therefore, demonstrated that treatment of sensitive cells to MV by type I IFN can block their infection, while the use of ruxolitinib, an inhibitor of type I IFN signaling, on the resistant cell lines, rendered them sensitive to MV. These results confirm oncolytic MV as a viable therapeutic option for malignant melanoma and also suggest that the sensitivity of these cells to MV is dependent on both the level of expression of CD46 and defects of the type I IFN pathway.

Key Words

Melanoma-Oncolytic Virus - Measles Virus - antitumor virotherapy – type I interferon – Ruxolitinib