

Thèse de Doctorat

Joëlle NADER

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

École doctorale : *Biologie-Santé*

Discipline : *Biologie, Médecine et Santé*

Spécialité : *Cancérologie*

Unité de recherche : *UMR1232 INSERM (CRCINA)*

Soutenue le 14 Décembre 2017

Thèse N° :

Modèles précliniques d'étude du mésothéliome : application à l'évaluation de la virothérapie anti-tumorale *in vivo*

JURY

Président :	Olivier Coqueret , Professeur, Université d'Angers, UMR1232, ICO Paul Papin
Rapporteurs :	Michèle Beau-Faller , Professeur, Centre Hospitalier Universitaire de Strasbourg Luc Willems , Professeur, Université de Liège
Examineurs :	Olivier Coqueret , Professeur, Université d'Angers, UMR1232, ICO Paul Papin
Directeur de Thèse :	Daniel Pouliquen , Chargé de recherche, UMR1232 Nantes
Co-encadrant de Thèse :	Nicolas Boisgerault , Chargé de recherche, UMR1232 Nantes

Je dédie ma thèse à,

Mes parents.

Sans vous je ne serais jamais arrivée jusqu'ici.

Merci pour votre soutien, patience et encouragement.

J'espère que vous serez fiers de moi !

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres rapporteurs et examinateurs du jury, le Pr. Michèle Beau-Faller, le Pr. Luc Willems et le Pr. Olivier Coqueret pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je tiens aussi à remercier le Dr. Marc Grégoire pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir donnée la chance de réaliser ma thèse au sein de son équipe. Un grand merci pour mon directeur de thèse, le Dr. Daniel Pouliquen, pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de ces 3 années, pour sa disponibilité et les connaissances qu'il m'a transmises. Je remercie également mon co-encadrant de thèse, le Dr. Nicolas Boisgerault, pour avoir accepté de diriger ce travail et de sacrifier beaucoup de son temps. Merci pour ses encouragements, son soutien et sa bonne humeur. Un grand merci à tous les membres de l'équipe pour leur accueil chaleureux, leur convivialité, leur aide précieuse et leur écoute qui m'ont accompagné durant toute ma thèse.

Je souhaite ensuite remercier les membres de mon comité de thèse, le Dr. Jérôme Abadie et le Dr. Laëtitia Gautreau qui ont suivi l'évolution de mon travail tout au long de ces trois années et qui m'ont donné des conseils instructifs qui m'ont permis de mener à bien cette thèse.

Enfin, je tiens à remercier tous nos collaborateurs de l'équipe 12 (CRCINA), notamment le Dr. Catherine Guette, de l'Institut Pasteur de Paris, d'Oniris et de Transgene pour leurs conseils, leur expertise et leur disponibilité.

QUELQUES MOTS DE RECONNAISSANCE

J'avoue que l'écriture de cette partie a été très difficile pour moi non seulement car cela concrétise la fin de cette aventure mais aussi car il est temps de passer à un nouveau chapitre de ma vie qui sera potentiellement loin de vous!

Je commence par le meilleur chef d'équipe et d'unité **Marc**. Je te remercie énormément pour m'avoir accueillie dans ton équipe et m'avoir donnée la chance de travailler sur un sujet si passionnant. Ce n'est pas un hasard que tu sois chef d'unité. Ta motivation, ta passion et la gestion de ton travail m'ont toujours impressionnée ! Je n'oublierai jamais ta gentillesse, ton intérêt pour le Liban et les petites histoires que tu as vécu dans ce pays ! Si jamais tu y retournes je serai ton guide touristique 😊

Daniel, je te remercie énormément pour ces trois années passées avec toi ! Je te remercie pour toutes les connaissances scientifiques et ton expertise en expérimentation animal que tu m'as transmise. Merci pour ta confiance, ta patience, ton écoute et ta disponibilité ! Tu m'as appris à être autonome en me donnant de la liberté, en m'encourageant à prendre des initiatives et à diriger mon sujet tout en restant vigilant au travail que je menais. Je suis consciente et très reconnaissante de la chance que j'ai eu de t'avoir comme directeur de thèse.

Je me souviendrai toujours de mon premier congrès international iMig à Birmingham. C'était un grand moment pour moi. Merci de m'avoir rassurée et répondu à toutes mes questions quand j'étais en plein stress pour ma présentation orale et mon poster ! Je n'oublierai jamais les bons moments qu'on a vécu avec Marc, Christophe et Camille et les nombreux « Selfie » que je vous ai imposés. 😊

Ton intérêt pour le Liban (tes questions sur la politique, la religion et la cuisine libanaise) m'a toujours fait plaisir ! Mais il ne faut pas se mentir il te faut encore beaucoup travailler sur la prononciation des mots comme par exemple Naanaa ! 😊

Je te souhaite Daniel une très belle carrière ! Garde en toi cette ambition que tu as et j'espère sincèrement voir un jour ton nom dans les plus grands journaux ! Bon courage pour la suite et pour la garde du chien et du lapin de ta fille en plus de celle de ton chat! ☺

Jeff, je te remercie pour toutes les discussions scientifiques qu'on a partagées ensemble et pour ta disponibilité face à mes questions sur les voies de signalisation et les virus ! Ton enthousiasme face aux résultats et tes connaissances en immunologie m'ont toujours impressionnée !

Un grand merci pour toutes les expressions françaises que tu m'as apprises et ton éducation musicale française ! Parmi les chansons que tu m'as fait découvrir, mes préférées étaient « ça me vénère oui ça me vénère » et aussi « un Tibo, deux tibo, trois tibo doudou! ». ♪ ☺

Christophe, merci pour tes conseils, tes discussions scientifiques et ta disponibilité quand j'avais des questions sur certaines de mes manip. Ta persévérance et la gestion de tes nombreux projets m'ont toujours fascinée. J'espère que tu arriveras, avec l'aide de Sophie et Soizic, à avoir la biocollection de MM que tu souhaites ! ☺

Nico, appelé aussi Nicoletta ou boizero, que dire de toi ! Je n'ai jamais connu une personne avec un esprit si mal tourné ! ☺ ☺ Non je rigole ! Je te remercie énormément pour tout ce que tu as fait pour moi ! Depuis mon arrivée dans l'équipe, tu m'as suivie et aidée dans mes manip avant même que tu sois officiellement mon co-encadrant ! Tu es d'une gentillesse et d'une intelligence rare ☺ tu as bien mérité ton poste de chercheur ! Un grand merci pour ta rigueur dans la correction du manuscrit. Je sais que je t'ai saoulé avec mes fautes de français mais ta récompense sera une assiette de « Chanklich » que pour toi le jour de la soutenance ☺

J'ai été ravie d'aller avec toi au congrès ASCGT à Washington ! C'était une expérience exceptionnelle et la première fois que je voyageais aux Etats Unis. La suite était à New York où nous avons pu visiter les sites touristiques mais surtout faire du shopping ! Je me souviendrai toujours des prénoms qui nous ont été donnés à Starbucks « JOA » et « NIKOLI » ainsi que de ton orteil coloré en bleu ! ☺

Même si tu m'embêtais la plupart du temps, on a bien rigolé durant ces trois années avec Tiph, Vivi et plus récemment Petithomme. 😊 Je n'oublierai jamais toutes nos soirées et sorties qu'on a faites ensemble. Je suis fière de t'avoir eu comme étudiant en langue arabe ! Toutefois tu dois retravailler ton cours des couleurs mais en général je suis satisfaite de toi ! Yalla on se donne rendez-vous au Liban ! Kesak! 😊

Tiphaine, je suis vraiment chanceuse d'avoir commencé ma thèse au même moment que toi ! Depuis le premier jour on s'est bien entendues et on est devenues non pas de simples collègues mais de vraies amies ! Je te remercie pour ton soutien tout au long de ces trois années et ta présence dans mes périodes difficiles. Tu es vraiment une fille géniale pleine de vie et de motivation ! Je suis sûre que tu vas assurer pour ta soutenance l'année prochaine et décrocher un post-doc aux Etats Unis comme tu le souhaites. 😊

J'ai beaucoup apprécié de travailler avec toi surtout en salle de culture où on manipulait sur les notes de Maître Gims et Kendji Girac ! Je n'oublierai jamais tout ce qu'on a vécu ensemble : nos soirées, notre voyage à Lisbonne et notre chanson « Mon beau poster Roi des posters » 😊. Et pour finir, je te remercie d'avoir pris la responsabilité de me traduire toutes les expressions coquines qui venant évidemment de Mr Nicoletta 😊. Je t'attends avec impatience au Liban ! J'espère qu'on restera en contact car je tiens à notre amitié ! Tu vas beaucoup me manquer ma petite tiph !

Camille, on a commencé tous les deux nos thèses au même moment, on a fait notre premier congrès international iMig à Birmingham, assisté au congrès CGO et passé la formation d'expérimentation animal ensemble ! Et nous y voilà, c'est la fin pour nous deux aussi! 😊

J'ai beaucoup apprécié tous ces moments vécus avec toi ! Je n'oublierai jamais tes cours de rigologie, les images, disons bizarre que tu nous montrais à chaque fois et ta musique en salle de culture 😊. Je suis sûre que tu vas assurer pour ton post-doc à New York ! Bon courage, pour toi et ta belle Léa, pour votre nouvelle vie ! Je vous attends tous les deux au Liban ! Voilà ce que j'ai à dire de toi, tu as intérêt donc à parler en bien de moi dans tes remerciements 😊.

Thibaut, le gentleman et le goulou de l'équipe ! Quelle chance d'avoir rencontré une personne comme toi ! J'aime bien ta gentillesse, ton aide et ton attention. Ton calme et la passion pour ton travail m'ont toujours impressionné ! Je suis sûre que tu vas avoir une très belle carrière !

Au cours de ces années, on a partagé plusieurs moments que je n'oublierai jamais dont ton mariage ! Ce mariage qui n'aurait jamais eu lieu sans le bon choix de la bague ! 😊 Merci de nous avoir invités à partager ce grand jour avec toi et ta Lulu 😊 c'était une première pour moi d'assister à un mariage français !

Je n'oublierai jamais votre présence à toi et Lucie dans mes périodes difficiles ! Vous avez toujours été là pour moi et je vous remercie beaucoup pour ça ! A chaque fois que je mangerai des sushis je penserai à vous 😊. Je te tiendrai toujours au courant des nouvelles de Roger Robert 😊.

Tacien, le benjamin de l'équipe ! Ton intelligence et tes connaissances dans tous les domaines me font peur ! Mais tu es un homme parfait !!! Tu es un génie, tu as de l'humour, tu joues du violon et du piano, tu sais danser, tu aimes les animaux et la cerise sur le gâteau tu es croyant !!! 😊 Tout ce qu'une femme souhaite ! 😊 Elle a vraiment de la chance Nina de t'avoir. Je ne doute pas qu'un jour je trouverai ton nom dans un « Nature »!

Bon courage mon petit pour la suite de ta thèse. J'espère que tu trouveras une solution pour les modèles animaux (chose que je n'ai pas pu faire !) Tu vas beaucoup me manquer ! Je compte sur toi pour maintenir notre rituel hebdomadaire de « bières et saucissons » 😊

Vivi, j'ai eu de la chance d'avoir ce bureau, après Carole, sans même déposer un dossier chez Stéphane 😊. On a partagé ensemble de bons moments depuis que je me suis installée à côté de toi ! Notre amour pour les bébés, les bagues et les chips a renforcé notre amitié ! 😊

J'apprécie beaucoup ta personnalité, ton humour et ta gentillesse ! Je te remercie pour ton aide et ton expertise au Canto ! Je reviendrai pour te rendre visite dans votre nouvelle maison et pour voir Wiwi et ton nouveau bébé qui j'espère sera une fille toute mignonne comme toi 😊.

Sophie, ma maman à l'étranger ☺ je te remercie pour tout ce que tu as fait pour moi ! Tu étais toujours prête à m'aider et me donner des conseils, non seulement pour mes manips, mais aussi pour n'importe quel sujet ! Je t'apprécie beaucoup et tu vas vraiment me manquer !

J'étais trop contente de partager avec toi et ta famille la soirée libanaise ! Ça m'a fait trop plaisir de te voir danser et de savoir que tes enfants ont passé un bon moment ☺. Merci pour tes interventions chirurgicales pour mes doigts et ton expertise dans la couture (c'est clair que je ne suis pas trop douée pour ça !) ☺. Bon courage pour ta nouvelle passion d'élevage des abeilles !! J'attends mon pot de miel ☺.

Soizic, tu es arrivée il y a peu de temps dans l'équipe mais j'ai l'impression que tu es parmi nous depuis longtemps ! Je regrette de n'avoir pu passer plus de temps avec toi et cela à cause de la rédaction de ma thèse. Je trouve que tu es une personne très sympa, intéressante et toujours souriante !

Delphine, je te remercie pour tous les monocytes que la plateforme nous a fourni et ton aide pour mettre en place le protocole d'activation des DCs ! ☺ Tu étais notre alarme du midi pour aller manger ☺ J'ai vraiment apprécié toutes les discussions qu'on a eues lors des déjeuners. Bon courage pour la suite.

Nina, même si tu n'étais plus dans notre équipe tu venais nous faire un petit coucou de temps en temps ! On a passé de bons moments ensemble à aller boire un verre avec tout le monde le soir et faire des restos ! Je n'oublierai jamais ta gentillesse et ta bonne humeur ! Je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite ☺.

Et voilà, j'ai fait le tour ! Merci beaucoup à tous de m'avoir très bien accueillie dans cette équipe. Vous étiez comme une famille pour moi ! C'est vraiment rare de trouver une telle ambiance ailleurs ! J'ai eu de la chance de travailler avec vous et de profiter de vos expériences précieuses ! Je repars du labo avec des moments inoubliables et des ami(e)s à qui je tiens beaucoup ☺

C'est le temps de dire la fameuse réplique de l'équipe « **Grégoire un Jour, Grégoire Toujours !** ». Et je rajouterai sur ça ma phrase favorite : « ***Vous les Français... Vous êtes Géniaux !*** »

Je tiens à remercier aussi mes ami(e)s Omar, Georges, Rita, Lucie, Johanna et Ernest qui ont toujours été là pour moi et avec qui j'ai passé des moments inoubliables ! J'ai de la chance de vous avoir connus ! Un petit mot spécial pour les Libanais Omar, Georges et Rita ! Vous êtes ma famille choisie ! Merci pour votre disponibilité, votre écoute, vos conseils et surtout votre grand amour !

Je remercie en particulier Rita ! Merci de m'avoir boostée à plusieurs reprises, d'avoir été disponible toujours pour moi et de m'avoir logée chez toi et tes parents quand j'avais besoin d'une famille à mes côtés. On se ressemble sur certains traits de notre caractère et c'est pour cela qu'on s'entend bien ☺ Je n'oublierai jamais tous les moments qu'on a partagés ensemble comme nos voyages à Londres, Lisbonne, la Croatie, Prague, l'Espagne et le Liban évidemment, notre jour de spa à deux ☺ et toutes nos sorties et nos soirées. Maintenant que tu passes à un nouveau chapitre de ta vie avec ton déménagement de chez tes parents, je te souhaite plein de bonnes choses et tout le bonheur du monde ! ☺ Même si la distance va nous séparer, pour un certain temps peut-être, n'oublie pas que je serai toujours là pour toi ! Tu vas me manquer énormément ! ☹

Je remercie également Jad. Merci beaucoup de m'avoir toujours soutenue, supportée et cru en moi ! Je suis consciente que je t'ai saoulé avec mes histoires sur les manips qui ne fonctionnaient pas et les problèmes que je rencontrais mais tu essayais toujours de me trouver des solutions sans forcément comprendre de quoi je parlais (ce qui était normal) ☺ Merci pour ton temps sur skype où je te répétais toutes mes présentations. Malgré les quelques 4450km qui nous séparaient, tu as été présent quand ça allait et quand ça n'allait pas ! ☺

Pour finir, je tiens à remercier énormément les plus importants à mes yeux : mes très chers parents, ma sœur Joyce et mon frère Rony. Même si c'était difficile pour vous au début de me voir partir, vous avez toujours cru en moi et m'avez toujours encouragée ! Sans vous je n'en serai pas là aujourd'hui. Merci pour votre confiance et votre soutien ☺ J'espère vraiment que vous êtes fiers de moi !

Merci à tous, j'espère vous voir au Liban très prochainement !

Joëlle la Libanaise ☺

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS.....	14
------------------------------------	-----------

INTRODUCTION	18
---------------------------	-----------

I. Le mésothéliome malin	19
1. Définition	19
2. Les cellules mésothéliales	20
3. Epidémiologie	21
3.1 Incidence	21
3.2 Survie et taux de mortalité.....	22
4. Etiologie	22
4.1 Exposition aux fibres d'amiante.....	23
4.2 Exposition à d'autres types de fibres.....	24
4.3 Virus SV40	24
4.4 Prédispositions génétiques	25
5. Pathogenèse	25
5.1 Inflammation chronique	25
5.2 Les gènes suppresseurs de tumeurs	26
5.3 Facteurs de croissance	27
5.4 Résistance à l'apoptose	27
5.5 Mécanismes d'échappement tumoral du MM.....	27
6. Diagnostic.....	29
6.1 L'imagerie	30
6.2 L'analyse cytologique	30
6.3 L'analyse immuno-histochimique.....	31
6.4 Les biomarqueurs solubles	32
7. Classification anatomo-pathologique du MM.....	33
7.1 Mésothéliome malin épithélioïde	34
7.2 Mésothéliome malin sarcomatoïde.....	34
7.3 Mésothéliome biphasique.....	34
7.4 Mésothéliome desmoplastique	34
8. Prise en charge thérapeutique.....	35
8.1 Chirurgie.....	36
8.2 Chimiothérapie	36
8.3 Radiothérapie	37
8.4 Traitement multimodal.....	37
8.5 Alternatives thérapeutiques	37

8.5.1	Immunothérapie	37
a.	Cytokines.....	38
b.	Transfert adoptif de lymphocytes T	39
c.	Vaccins thérapeutiques.....	39
d.	Inhibition des points de contrôle immunitaires	40
8.5.2	Thérapies ciblées	40
8.5.3	Agents épigénétiques.....	41
II.	Modèles précliniques de mésothéliome	44
1.	Modèles de xénogreffes	44
2.	Modèles immunocompétents.....	45
III.	Virothérapie anti-tumorale	48
1.	Principe.....	48
2.	Principaux virus oncolytiques	49
2.1	Virus à ADN.....	49
2.1.1	Virus de la vaccine	49
2.1.2	Adénovirus	50
2.1.3	Herpèsvirus.....	51
2.1.4	Parvovirus.....	52
2.2	Virus à ARN.....	53
2.2.1	Réovirus	53
2.2.2	Virus de la maladie de Newcastle	54
2.2.3	Poliovirus	54
2.2.4	Virus de la stomatite vésiculaire (VSV).....	54
2.2.5	Autres virus	55
3.	Virus de la rougeole	55
3.1	Les différentes souches du virus de la rougeole.....	55
3.2	Structure	57
3.2.1	La nucléoprotéine N	58
3.2.2	La phosphoprotéine P	58
3.2.3	La protéine L	58
3.2.4	La protéine de matrice M	59
3.2.5	La protéine de fusion F.....	59
3.2.6	L'hémagglutinine H	60
3.3	Récepteurs et tropisme	61
3.4	Cycle réplicatif	63
3.4.1	L'entrée virale	64
3.4.2	La transcription et réplication	64
3.4.3	L'assemblage et bourgeonnement.....	65
3.4.4	La formation de syncytia.....	65
3.5	Les protéines non-structurales du virus de la rougeole	66
3.5.1	Place de la protéine V dans l'infection.....	66
3.5.2	Place de la protéine C dans l'infection.....	68
4.	Utilisation du virus de la rougeole en virothérapie anti-tumorale.....	69

4.1 Ciblage spécifique des cellules tumorales.....	70
4.1.1 Surexpression du récepteur CD46.....	70
4.1.2 Défauts dans la réponse IFN de type I	70
4.2 Etudes précliniques	71
4.3 Amélioration de l'effet oncolytique du MV.....	71
4.3.1 Amélioration du tropisme du MV	72
4.3.2 Suivi de la réplication virale.....	73
4.3.3 Combinaisons thérapeutiques.....	74
a. La radiovirothérapie	74
b. La chimiovirothérapie	75
c. L'immunovirothérapie	75
4.4 Etudes cliniques.....	76
IV. Réponse immunitaire et virothérapie anti-tumorale	80
1. Défense immunitaire contre la réplication virale	80
1.1 La réponse IFN de type I.....	80
1.2 Anticorps neutralisants	82
2. Système immunitaire et virothérapie : effet synergique.....	83
3. Implication du MV dans la réponse immunitaire anti-tumorale	85
3.1 Induction de la mort cellulaire immunogène.....	85
3.2 Induction d'une réponse LT CD8 ⁺ efficace	85
OBJECTIFS DE LA THESE	88
RESULTATS.....	91
Article n° 1 : Characterization of increasing stages of invasiveness identifies stromal/cancer cell crosstalk in rat models of mesothelioma	92
Article n°2 : Knockout of the C protein improves the oncolytic and immunotherapeutic properties of Measles Virus	134
Article n°3 : High oncolytic activity of a double deleted Vaccinia Virus Copenhagen strain against pleural mesothelioma	169
DISCUSSION	186
REFERENCES	197
ANNEXES	215
Annexe n°1 : Characterization of preneoplastic and neoplastic rat mesothelial cell lines: the involvement of TETs, DNMTs, and 5-hydroxymethylcytosine	216
Annexe n°2 : Communications orales à des congrès nationaux et internationaux	241
Annexe n°3 : Posters présentés à des congrès nationaux et internationaux	242

LISTE DES ABREVIATIONS

5-FC : 5-fluorocytosine
5-FU : 5-fluorouracile
5-FUMP : 5-fluorouridine-monophosphate
Ad : Adénovirus
ADN : Acide Désoxyribonucléique
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
Bcl-xL : B-cell lymphoma-extra large
CARs : Chimeric Antigen Receptor
CCL : Chemokine (C-C motif) ligand
CCP : Complement Control Protein repeat
CEA : Carcinoembryonic Antigen
CMH : Complexe majeur
 d'histocompatibilité
CPAs : Cellules présentatrices d'antigènes
CT : Computed tomography
CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4
DAMPs : Danger-associated molecular
 patterns
DCs : Cellules dendritiques
dsRNA : Double-stranded Ribonucleic acid
EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
FDA : Food and Drug Administration
FP : Fusion peptide
GBM : Glioblastome Multiforme
GFP : Green fluorescent protein
GM-CSF : Granulocyte macrophage
 colony-stimulating factor
HDAC : Histones désacétylases
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HMGB1 : High mobility group box 1
HR : Heptad Repeat

HSP : Heat shock protein
HSV : Herpes Simplex Virus
ICP : Infected cell protein
IFIT-1 : Interferon induced protein with
 tetratricopeptide repeats 1
IFN : Interferon
IGF : Insulin-like growth factor 1
IKK : I κ B kinase
IL : Interleukin
INCa : Institut National du Cancer
InVS : Institut de Veille Sanitaire
IRF-3 : Interferon Regulatory Factor 3
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
ISG : Interferon-Stimulated Gene
JAK : Janus kinase 1
LqP : Liquide pleural
MAPK : Mitogen-activated protein kinase
MAVS : Mitochondrial antiviral-signaling
 protein
Mcl-1 : Induced myeloid leukemia cell
 differentiation protein
MDA-5 : Melanoma differentiation
 associated factor 5
MDSC : Myeloid-derived suppressor cells
MeP : 6-methylpurine
MeP-dR : 6-methylpurine-2'-deoxyriboside
MIP-2 : Macrophage Inflammatory Protein-2
miR : microARN
MM : Mésothéliome malin
MPM : Mésothéliome pleural malin
MV : Measles virus
NAP : Neutrophil-activating protein

NDV : Newcastle disease virus

NF2 : Neurofibromatosis type 2

NF- κ B : Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NIS : Sodium iodide symporter

NK : Natural Killer

NLRP3 : NOD-like-receptor-family, pyrin domain-containing 3

P/D : pleurectomie / décortication

PAMPs : pathogen-associated molecular patterns

PBMCs : Peripheral Blood Mononuclear Cells

PD-1 : Programmed cell death protein 1

PDL-1 : Programmed cell death ligand 1

PEGF : Platelet-Derived Growth Factor

PEP : Pneumonectomie Extrapleurale

PET : Positron Emission Tomography

PKR : Protein kinase R

PNP : Purine Nucleoside Phosphorylase

PNSM : Programme National de Surveillance du Mésothéliome

PP1 : Protein Phosphatase 1

PRRs : Pattern recognition receptors

Rantes : Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted

RIG-1 : Retinoic Acid Inducible Gene 1

RLR : RIG-1 like receptor

RNA : Ribonucleic acid

RR : Ribonucleotide reductase

SAHA : Suberoylanilide hydroxamic acid

SCD : Super-cytosine deaminase

SCR : Short Consensus Repeats

SEM : Scanning electron microscopy

SLAM : Signalling Lymphocyte Activation Molecule

SMRP : Serum mesothelin-related peptide

SPECT : Single-photon emission computed tomography

STAT : Signal transducer and activator of transcription

SV40 : Simian Virus 40

TAA : Tumor-associated antigens

TCID₅₀ : Tissue culture infectious dose 50%

Th1 : Type 1 T helper

TIL : Tumor Infiltrating-Lymphocytes

TK : Thymidine kinase

TLR : Toll-like receptor

TM : Domaine transmembranaire

TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α

T-VEC : Talimogene laherparepvec

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VSV : Virus de la stomatite vésiculaire

WT1 : Wilms tumor 1

INTRODUCTION

I. Le mésothéliome malin

1. Définition

Le mésothéliome malin (MM) est une tumeur rare et très agressive qui se développe à partir des cellules mésothéliales des différentes séreuses de l'organisme : plèvre, péritoine, péricarde et tunica vaginalis. Le mésothéliome pleural malin (MPM) représente la majorité des cas (80%) [1], suivi par le mésothéliome péritonéal représentant 7 à 30% des cas [2]. La plèvre est un double feuillet recouvrant d'une part les poumons (feuillet intérieur ou plèvre viscérale) et d'autre part la paroi interne du thorax (feuillet extérieur ou plèvre pariétale). Ces deux feuillets délimitent un espace occupé par un liquide, appelé liquide pleural (LqP), jouant le rôle d'un lubrifiant assurant le glissement des deux feuillets l'un contre l'autre lors de la respiration (figure 1.a).

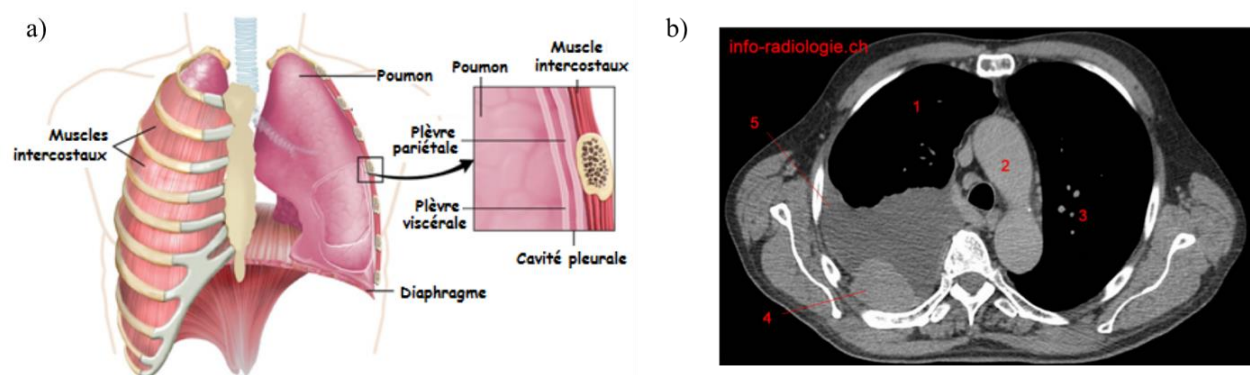


Figure 1. La plèvre et le mésothéliome pleural malin (MPM)

a) Représentation schématique de la plèvre : la plèvre pariétale est accolée à la cage thoracique alors que la plèvre viscérale recouvre la face externe des poumons. Entre les deux plèvres existe un espace large de quelques micromètres, l'espace pleural, dans lequel réside une faible quantité de liquide répartie sur toute la surface pleurale. b) Scanner thoracique (reconstitution axiale) d'un patient atteint de MPM : 1, Poumon droit. 2, Crosse de l'aorte. 3, Poumon gauche. 4, Masse à base pleurale. 5, Épanchement pleural. Source : a) <http://ressources.unisciel.fr/physiologie> b) www.info-radiologie.ch/mesotheliome

Lors d'une exposition prolongée aux fibres d'amiante et de l'apparition d'un MPM, la plèvre est envahie par des cellules cancéreuses. Elle peut s'épaissir et produire massivement du LqP, ce qui va causer des difficultés respiratoires, ou dyspnée, qui constituent le symptôme majeur de ce cancer. En effet, chez les personnes saines la quantité du LqP sécrété est d'environ 15 mL, alors que cette quantité peut atteindre deux litres chez les patients atteints de MPM (figure 1.b).

Le péritoine est une autre membrane séreuse qui recouvre tous les organes de l'abdomen. Il est constitué de deux feuillets, l'un tapissant la cavité abdominale et l'autre entourant les organes et délimitant un espace virtuel appelé cavité péritonéale. Comme pour le MPM, le mésothéliome péritonéal est majoritairement dû à une exposition aux fibres d'amiante et se manifeste par un épaississement péritonéal irrégulier ou nodulaire avec formation d'ascite. Il est généralement accompagné d'un gonflement et de douleurs abdominales [3].

2. Les cellules mésothéliales

Les cellules mésothéliales forment une monocouche, appelée mésothélium, qui s'étend sur toute la surface des cavités séreuses (pleurale, péricardique et péritonéale) et les organes contenus dans ces cavités. Elles ont des formes variées (rondes, cubiques ou aplaties) avec une taille d'environ 25µm de diamètre et un cytoplasme entourant un noyau ovoïde présentant un nucléole. Les cellules contiennent des microtubules et des microfilaments, du glycogène, des vésicules et des vacuoles, peu de mitochondries, un appareil de Golgi peu développé et un petit réticulum endoplasmique rugueux. La surface de ces cellules est couverte par des microvillosités, environ 600 par cellule, qui jouent différents rôles dans la protection et le maintien de l'intégrité du mésothélium (figure 2).

Les cellules mésothéliales constituent une barrière de défense contre les microorganismes et les cellules tumorales envahissantes. Après une blessure ou une exposition à des organismes étrangers, ces cellules sont capables de déclencher une réponse inflammatoire par la sécrétion de plusieurs protéases, cytokines, facteurs de croissance et autres médiateurs inflammatoires, et une réponse immunitaire spécifique par la présentation d'antigènes aux cellules lymphocytaires T.

En outre, les cellules mésothéliales facilitent le transport des fluides et des cellules à travers les cavités séreuses et fournissent une surface glissante non adhérente pour faciliter le mouvement libre des organes internes et éviter l'adhésion des cellules tumorales. Elles sont aussi impliquées dans la synthèse de prostaglandines et dans la fibrinolyse [4].

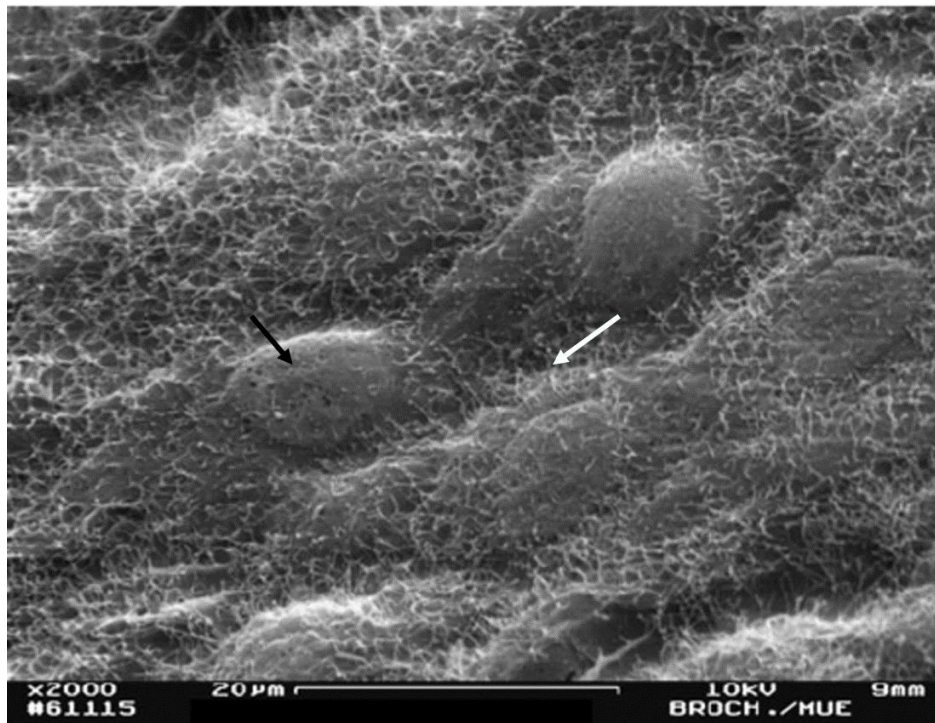


Figure 2. Morphologie du mésothélium

Une photographie au microscope électronique à balayage (SEM) montrant une monocouche de cellules mésothéliales aplaties (flèche noire) avec de nombreuses microvillosités (flèche blanche). Grossissement : x2000. Tiré de : Brochhausen *et al.* Current strategies and future perspectives for intraperitoneal adhesion prevention. J Gastrointest Surg. 2012 [5].

3. Epidémiologie

3.1 Incidence

L'utilisation massive de l'amiante dans les pays industrialisés depuis les années 1950 a été suivie par une augmentation substantielle et régulière de l'incidence du MM. Dans certains pays tels que l'Australie et l'Angleterre ainsi qu'en Amérique du nord, cette incidence est toujours en augmentation [6] du fait de l'utilisation importante de l'amiante dans l'industrie jusque dans les années 1980. En France, cette utilisation a été strictement contrôlée dès 1978 et définitivement interdite en 1997. Un programme national de surveillance du mésothéliome (PNSM) a été créé début 1998 et est piloté par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS). Il couvre actuellement 23 départements et a pour but d'estimer l'incidence du mésothéliome et son évolution dans le temps, mais aussi de contribuer à la recherche et à l'amélioration de son diagnostic. Selon la PNSM, de nouveaux cas sont encore diagnostiqués en raison de la longue latence de la maladie mais le pic

d'incidence chez les hommes a été atteint entre 2000 et 2005 [7]. Toutefois l'incidence continuerait à croître pour les femmes. Le nombre annuel de cas de mésothéliomes en France est estimé entre 800 et 1200. Ce cancer prédomine chez les hommes et est dû le plus souvent à une exposition professionnelle mais parfois environnementale [8], notamment chez les femmes.

3.2 Survie et taux de mortalité

Le mésothéliome est un cancer dont le pronostic est très défavorable. Son diagnostic se fait généralement à un stade très tardif en raison de sa période de latence, qui varie entre 20 et 40 ans, et de ses symptômes non spécifiques. En France, l'âge moyen du diagnostic est de 70 ans chez l'homme et de 67 ans chez la femme ce qui rend le traitement chirurgical très difficile. Les patients meurent en moyenne entre 10 et 17 mois après le diagnostic [9]. Selon une enquête faite récemment par l'InVS et l'Institut national du cancer (INCa) sur le taux de survie à 5 ans chez des personnes atteint de cancer sur la période 2005-2010, c'est le cancer le plus mortel chez l'homme avec 4% de survie et le deuxième cancer le plus mortel chez la femme avec une survie de 11% (figure 2).

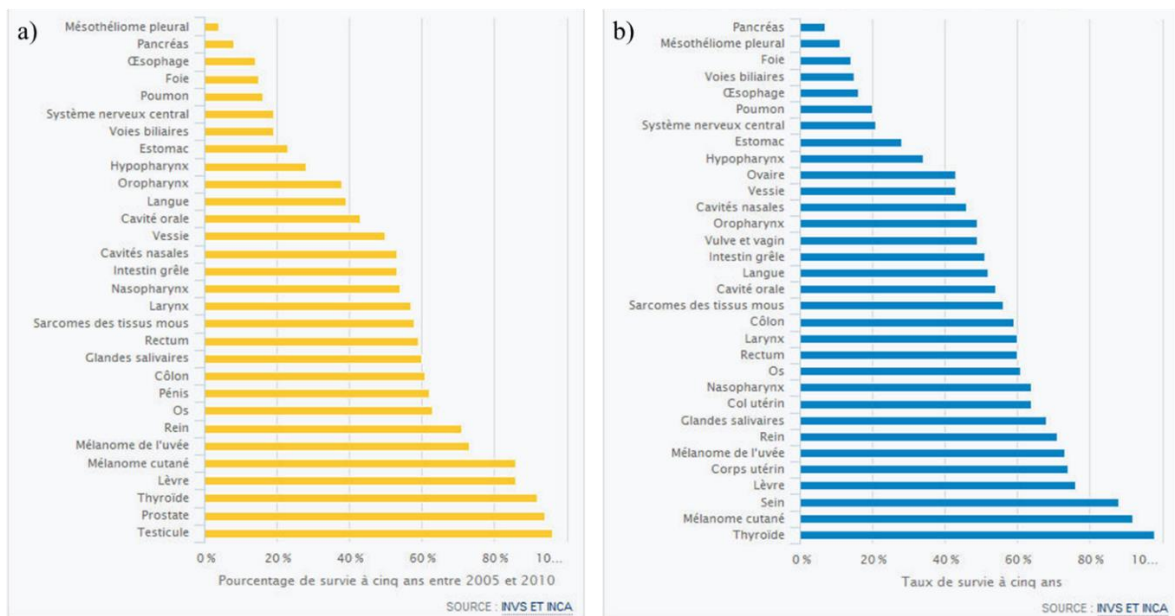


Figure 2. Taux de survie à 5 ans chez des patients atteints de différents types de cancers

a) Chez l'homme, le mésothéliome est le cancer le plus mortel avec 4% de survie. b) Chez la femme, le mésothéliome est le 2^{ème} cancer le plus mortel, après celui du pancréas, avec 11% de survie. Sources: INVS ET INCa.

4. Etiologie

L'exposition professionnelle à l'amiante a depuis longtemps été identifiée comme le facteur de risque principal pour le développement du MM. Sur une cohorte de 141 millions de patients diagnostiqués entre 1970 et 1979, 82% des cas étaient associés à une exposition professionnelle [10]. Toutefois, tous les cas ne sont pas liés à cette cause. L'identification d'un nombre significatif de patients sans exposition professionnelle à l'amiante a conduit à la reconnaissance des expositions para-professionnelles et domestiques, par exemple aux vêtements de travail souillés avec des particules d'amiante [11, 12]. En effet, une étude impliquant 1780 femmes dont les partenaires étaient employés dans une usine d'amiante-ciment à Casale Monferrato, en Italie, a signalé un diagnostic de malignité pleurale chez 21 patientes, soit 18 fois supérieur à ce qui était attendu dans la population [13]. Cela était lié à la pratique des épouses qui battaient les vêtements pendant le nettoyage, induisant la suspension d'une concentration élevée de fibres dans l'air. Outre l'exposition professionnelle et domestique, l'exposition naturelle à l'amiante représente une proportion importante des cas de MM dans plusieurs régions mondiales. Par exemple, la présence de grandes quantités de serpentine et de roches ultramafiques dans la Sierra Nevada, les chaînes de la côte et les montagnes de Klamath a été impliquée dans l'apparition de MM chez les résidents californiens [14]. D'autres agents sont eux aussi impliqués dans la causalité du MM, tels que le virus simien 40 (SV40), quelques autres fibres minérales et des prédispositions génétiques.

4.1 Exposition aux fibres d'amiante

Le mésothéliome malin était extrêmement rare jusque dans les années 1950 à partir desquelles il y a eu une utilisation massive des fibres d'amiante dans les pays industrialisés. L'amiante est une fibre minérale naturelle appartenant à la famille des silicates. Elle est formée de deux principaux groupes : les serpentines et les amphiboles. Les serpentines sont représentées par le chrysotile (amiante blanc) qui est la variété la plus utilisée (figure 3.a). Les amphiboles comprennent deux variétés commercialisées : la crocidolite (amiante bleu) et l'amosite (amiante brun) (figures 3.b et 3.c) et d'autres variétés non commercialisées qui sont des contaminants naturels tels que la trémolite, l'actinolite et l'antophyllite (figure 3.d, 3.e et 3.f) [15]. Parmi ces différents types d'amiante, la crocidolite est considérée comme le type le plus oncogène. En fait, ces fibres longues et minces, spécialement celles qui mesurent plus de 8µm de longueur et moins

de 2,5µm de largeur, sont les plus dangereuses car elles sont capables de pénétrer au fond des poumons entraînant ainsi des dégâts dans la plèvre et une inflammation chronique [9].

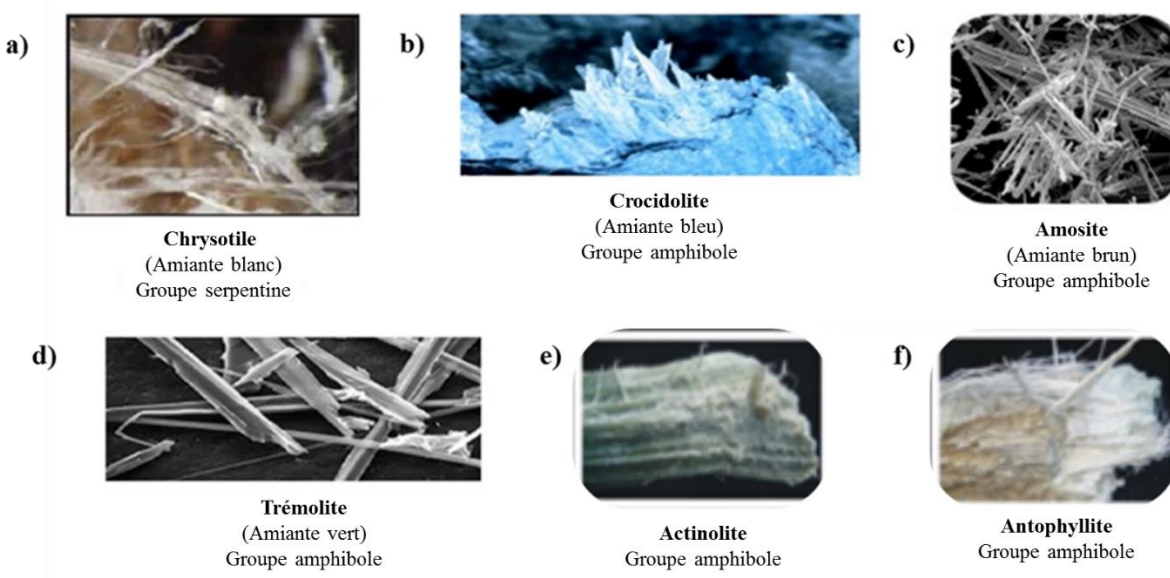


Figure 3. Différents types d'amiantes.

a) Chrysotile. b) Crocidolite. c) Amosite. d) Trémolite. e) Actinolite. f) Antophyllite.

4.2 Exposition à d'autres types de fibres

L'érianite est une fibre minérale correspondant au groupe des zéolithes. Elle est présente dans les roches volcaniques et peut être utilisée dans plusieurs industries telles que la construction des bâtiments, des routes et des égouts. L'intérêt pour cette fibre dans le cadre du MM a commencé avec la découverte, par Baris et ses collègues [16], d'une forte incidence de MM dans certains villages (Karain, Tuzkoy et Sarihidir) de Cappadoce en Turquie, qui a été attribuée à la présence de fibres d'érianite, dont un fort pourcentage de fibres inhalables, dans les roches volcaniques présentes dans cette région du pays. Des expériences *in vivo* chez des rats et des souris injectés avec de l'érianite montrent également une production de MM dans 90% des cas [17, 18].

Des cas de MM ont aussi été attribués à la présence de la fluoro-édénite, une fibre amphibole, à Bienavilla en Sicile [19, 20]. Elle est similaire, en morphologie et en composition, à l'actinolite et à la trémolite.

4.3 Virus SV40

Le virus SV40 est un virus à ADN qui a été associé au MPM [21]. Ce virus potentiellement oncogène a été introduit dans diverses populations à travers des vaccins poliovirus contaminés [22]. Le rôle du SV40 dans la pathogenèse du mésothéliome reste controversé. Bien que cinquante laboratoires différents aient signalé une association positive de SV40 avec le MPM, d'autres n'ont pas pu mettre en évidence cette relation [23]. Toutefois, des expériences animales ont démontré une association claire entre le SV40 et le MPM. Par exemple, des hamsters injectés par voie intraveineuse ou intracardiaque avec du SV40 développent ainsi souvent un MPM dans les 6 mois qui suivent et plusieurs études *in vivo* rapportent un fort effet co-cancérogène en combinant l'administration d'amiante et de SV40 [24].

4.4 Prédispositions génétiques

Des facteurs familiaux peuvent aussi contribuer à la genèse du MM. Des prédispositions génétiques au mésothéliome chez les personnes exposées à l'érionite ont été observées dans la région turque de la Cappadoce [25]. Une étude faite en 2014 en Italie, concernant plusieurs familles atteintes par le mésothéliome, montre un facteur génétique potentiel en plus de l'exposition aux fibres d'amiantes [26]. Patel *et al.* ont récemment décrit le gène BAP1 (BRCA1 associated protein-1) comme étant un gène de prédisposition souvent muté dans ce type de cancer [27].

5. Pathogenèse

5.1 Inflammation chronique

L'inflammation chronique est un des paramètres majeurs intervenant dans la pathogenèse du MM. Un certain nombre d'études sur des modèles animaux et des patients ont démontré que l'inhalation ou l'injection de fibres d'amiante entraîne une réponse inflammatoire chronique caractérisée principalement par le recrutement de macrophages et de granulocytes neutrophiles et la production de chimiokines et de cytokines dans la plèvre ou le péritoine [28, 29]. Le médiateur initial de cette inflammation est la protéine HMGB1 (high mobility group box 1) qui, suite à l'exposition aux fibres d'amiante, est libérée par les cellules nécrotiques dans l'espace extracellulaire. Cette libération induit l'activation de l'inflammasome NLRP3 (NOD-like-receptor-family, pyrin domain-containing 3) [30], l'accumulation de macrophages et la sécrétion d'IL-1 β (Interleukin-1 β) et de TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) activant ainsi la voie de

signalisation NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), qui conduit finalement à une augmentation de la survie cellulaire et de la croissance tumorale [31] (figure 4). Récemment, Acencio *et al.* ont effectué des expériences *in vitro* pour caractériser la réponse inflammatoire aiguë des cellules mésothéliales endommagées par les fibres d'amiante ; ils ont montré que les cellules mésothéliales exposées à la crocidolite ou au chrysotile produisent des niveaux élevés d'IL-1 et d'IL-6, ainsi que de MIP-2 (macrophage inflammatory protein-2) [32]. Plusieurs études faites sur le sérum de patients atteints de MM ont aussi montré la présence des chimiokines IL-10 et Rantes (Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted) [33], CCL2 et CCL3 (chemokine (C-C motif) ligand 2 et 3) [34, 35]. Ces chimiokines jouent un rôle initial dans la progression et l'invasion du mésothéliome.

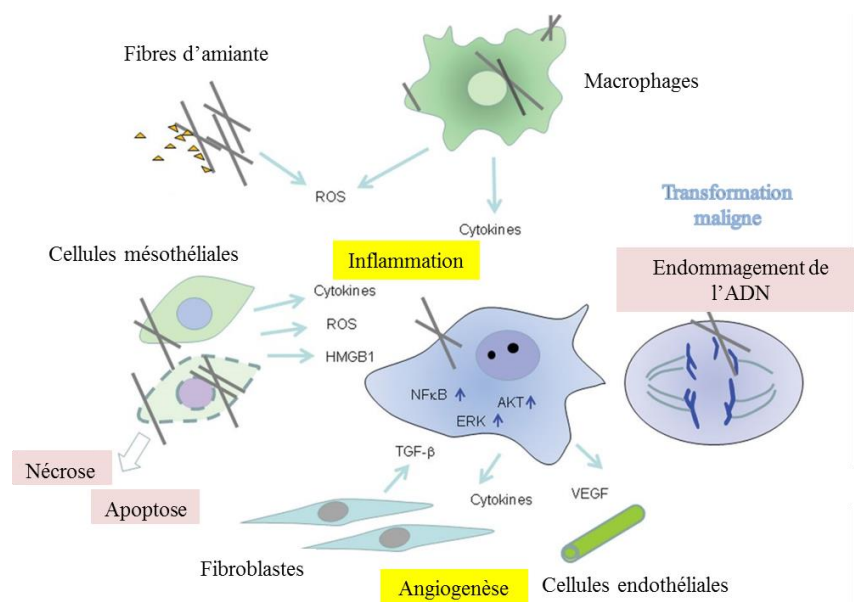


Figure 4. Pathogenèse associée aux fibres d'amiante

Dans un premier temps, les fibres d'amiante vont provoquer la mort des cellules mésothéliales, induisant la libération de HMGB1, de ROS (reactive oxygen species, dérivés réactifs de l'oxygène) et de plusieurs cytokines. Cela induit une inflammation permettant de recruter les macrophages qui vont phagocyter les fibres d'amiante sans pouvoir les digérer. Les macrophages vont libérer davantage de ROS et de cytokines, telles que le TNF- α , mettant en place une inflammation chronique, l'activation des voies de prolifération dans les cellules mésothéliales, des dommages dans l'ADN de ces dernières par les fibres d'amiante et l'initiation de la transformation maligne. (HMGB1, high-mobility group box 1 protein; TGF- β , transforming growth factor- β ; VEGF, vascular endothelial growth factor). Adapté de : Sekido, Y. Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma. *Carcinogenesis*. 2013 [36].

5.2 Les gènes suppresseurs de tumeurs

Les gènes suppresseurs de tumeurs jouent un rôle primordial contre le développement des cellules malignes. Ils sont notamment activés suite à des dommages de l'ADN et empêchent la prolifération cellulaire tout en favorisant la mort cellulaire. La perte de ces gènes est un facteur important de l'initiation d'une tumeur. Plusieurs études sur le profil génétique du MPM ont révélé des mutations diverses dans les gènes suppresseurs de tumeurs principalement impliqués dans la voie p53 [37, 38], tels que p16/INK4a et p14/ARF. Un autre gène suppresseur de tumeur, NF2 (Neurofibromatosis type 2), semble être assez spécifique du MPM puisqu'il a été retrouvé inactif dans environ 50% des cas [39].

5.3 Facteurs de croissance

Le MM, comme tout autre type de cancer, produit et répond à plusieurs facteurs de croissance. Parmi ces facteurs, l'EGF (Epidermal Growth Factor) et son récepteur EGFR sont fortement exprimés dans les MPM et sont statistiquement associés à un pronostic défavorable. *In vitro*, l'inhibition de l'EGFR se traduit par un contrôle de la croissance tumorale et par l'inhibition de l'angiogenèse [40]. Le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) et son récepteur, le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et son récepteur, ainsi que le HGF (Hepatocyte Growth Factor), sont également surexprimés dans ce type de cancer et aident à sa survie et sa prolifération [41, 42] [43].

5.4 Résistance à l'apoptose

La famille des protéines Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) est connue pour son rôle majeur dans la voie apoptotique intrinsèque. Ses membres comprennent à la fois des protéines pro-apoptotiques telles que les protéines Bax, Bak et Bad (Bcl-2 associated x, k, d) et anti-apoptotiques telles que Bcl-2, Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large) et Mcl-1 (Induced myeloid leukemia cell differentiation protein). Une expression élevée du gène anti-apoptotique Bcl-xL a été retrouvée dans le MPM et l'inhibition de son expression permet une augmentation de l'apoptose [44]. En outre, une réactivation de la télomérase, qui dans le cas des cellules normales est réprimée pour arrêter la croissance, est observée dans 90% des MPM [45].

5.5 Mécanismes d'échappement tumoral du MM

Lors du développement du MM, plusieurs barrières physiologiques complexes empêchent le maintien d'une bonne réponse immunitaire. Elles agissent sur plusieurs niveaux et impliquent la tumeur, son microenvironnement ainsi que divers composants du système immunitaire inné et adaptatif. Généralement, les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ (CTLs) et les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ (Th1, type 1 T helper) freinent le développement tumoral [46]. Cependant, l'inflammation chronique associée à ce type de cancer peut annuler ces effets et permettre la promotion du développement tumoral [47]. Une fois établi, le MM est capable d'exploiter différents mécanismes de régulation afin d'éviter ou d'atténuer la réponse immunitaire et d'assurer sa survie et sa croissance. Une de ces voies implique la polarisation des cellules T régulatrices CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ (Treg) [48]. Cela est assuré par une production accrue de TGF- β par les cellules tumorales, ce qui facilite la conversion des cellules T CD4⁺ en Treg suppressifs [49]. En effet, plusieurs études ont montré une infiltration de Treg dans des biopsies et des liquides pleuraux de MM [50, 51]. Les cellules myéloïdes, surtout les cellules suppressives dérivées de la lignée myéloïde (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs) ont elles aussi leur place dans l'évasion immunitaire. Elles sont recrutées dans le microenvironnement tumoral afin d'inhiber l'activité des CTLs, probablement par une diminution de l'expression de la chaîne ζ du récepteur des cellules T (TCR) [52]. De plus, la production de plusieurs types de cytokines, telles que TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1 et les interférons (IFN) de type I, peut paralyser le fonctionnement des CTLs et favoriser le développement tumoral. La diminution de l'expression des antigènes tumoraux et des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I à la surface des cellules [51, 53, 54], la présence massive de macrophages de phénotype M2 [55], la production d'une large quantité de la prostaglandine PGE2 et du TGF- β [51] et la capacité à résister à l'apoptose font que le mésothéliome présente un contexte immuno-modulateur lui permettant de rester invisible vis-à-vis du système immunitaire. Enfin, un des mécanismes potentiels d'échappement immunitaire utilisés dans les MM, en particulier le sous-type sarcomatoïde, le plus agressif, est l'expression de PDL-1 (programmed cell death ligand 1). PDL-1, en se liant au PD-1 exprimé sur les cellules T, induit leur anergie [56]. La figure 5 résume les différents mécanismes d'évasion immunitaire utilisés par les cancers.

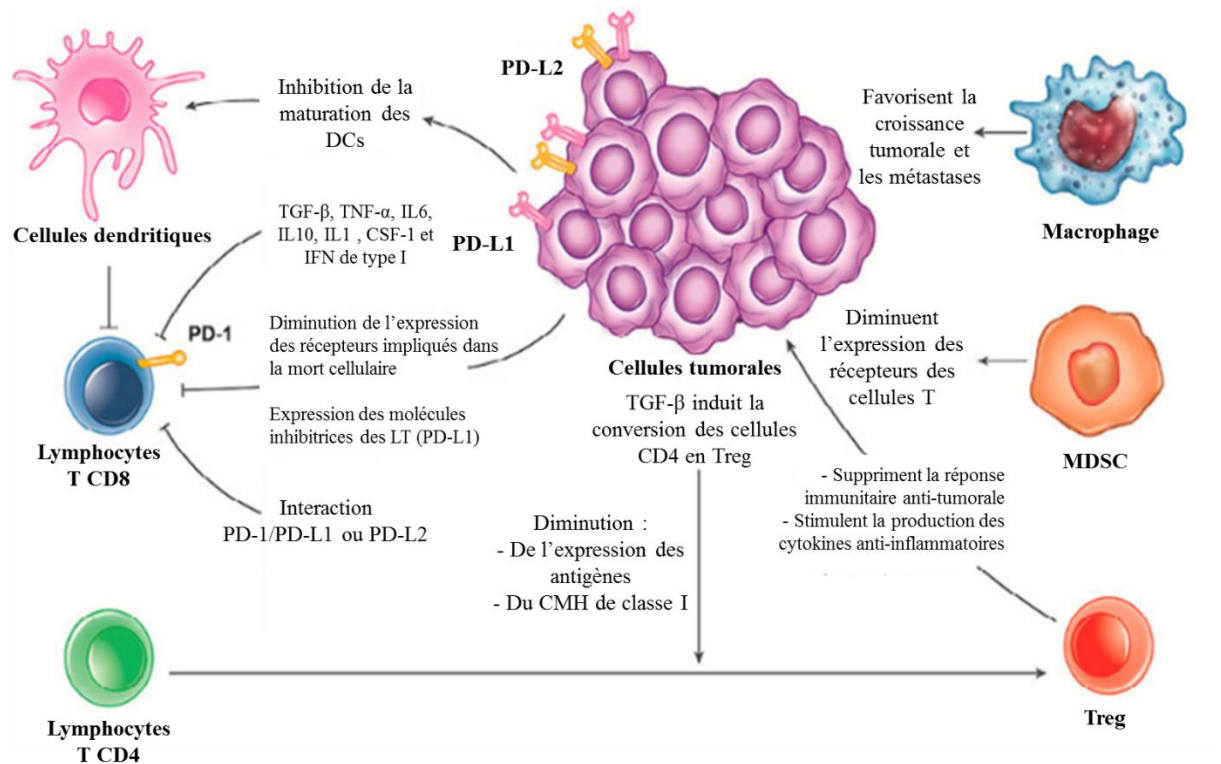


Figure 5. Mécanismes d'évasion immunitaire des cancers

PD-1 : programmed cell death protein 1 ; PD-L1 : programmed cell death ligand 1 ; PD-L2 : programmed cell death ligand 2 ; MDSC : myeloid-derived suppressor cells ; Treg : regulatory T cells. Tiré de : Thapa, B. *et al.* Immunotherapy for malignant mesothelioma: reality check. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2016 [56].

6. Diagnostic

Le mésothéliome est un cancer à diagnostic très défavorable à cause de l'absence de symptômes spécifiques (fatigue, fièvre, difficultés respiratoires, douleurs thoraciques). Pour cela, le diagnostic ne peut pas être basé uniquement sur les manifestations cliniques. De plus, il est très difficile de faire la différence entre un MM, une lésion bénigne et d'autres types de lésions communes à d'autres cancers. En effet, les métastases pleurales les plus communes proviennent des cancers du poumon (40%), du sein (20%) et du lymphome (10%) [57]. Plusieurs techniques complémentaires ont été mise en place pour améliorer le diagnostic de ce cancer.

6.1 L'imagerie

Bien que l'exploration par les méthodes d'imagerie ne soit pas spécifique à la détection du MM, ces résultats peuvent apporter un soutien en cas de suspicion de MPM. Les observations les plus courantes comprennent l'épanchement pleural, l'épaississement pleural et l'invasion locale.

Plusieurs méthodes d'imagerie sont utilisées pour le diagnostic. En raison de son utilisation facile et courante, la radiologie thoracique est souvent la première modalité à être utilisée. Elle permet de voir les effusions pleurales unilatérales présentes chez 80% des patients. L'épaississement pleural et les masses pleurales sont quant à eux observés dans respectivement 60% et 45-60% des cas [58].

Le scanner (CT : Computarized Tomography) est la modalité choisie pour évaluer l'étendue de la tumeur primaire, la localisation de l'invasion et la propagation extra-thoracique. Par cette technique, l'épaississement pleural est observé sous forme nodulaire ou lobulaire. La CT reste l'une des principales méthodes de détection des nodules intra-thoraciques. Les ganglions lymphatiques médiastinaux, en particulier les nœuds para-trachéaux, sous-artériels, para-œsophagiens et para-aortiques, de plus de 10mm de diamètre sont aussi considérés comme anormaux [59]. L'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) est plus sensible que le scanner. Elle est plus précise pour identifier les différents tissus mous et pour détecter l'invasion de la cage thoracique et le diaphragme. Enfin, la tomographie par émission de positons (PET, positron emission tomography) est la plus sensible, capable de différencier le MPM des lésions bénignes et de détecter des métastases [57].

6.2 L'analyse cytologique

Des ponctions pleurales sont souvent effectuées pour une étude cytologique qui permet de mettre en évidence des marqueurs de MPM. Cette méthode permet de décrire finement les cellules mésothéliales et leurs degrés d'atypies. Toutefois, seule, l'analyse cytologique ne peut pas porter un diagnostic définitif. Les marqueurs utilisés en premier lieu sont la calrétinine et la protéine Wilm's tumor 1 (WT1) qui déterminent si les cellules sont mésothéliales (figure 6.a ; 6.b). Le marqueur épithélial membranaire CA15-3, une forme soluble de la protéine mucin-1, permet ensuite de définir si les cellules sont malignes (figure 6.c).

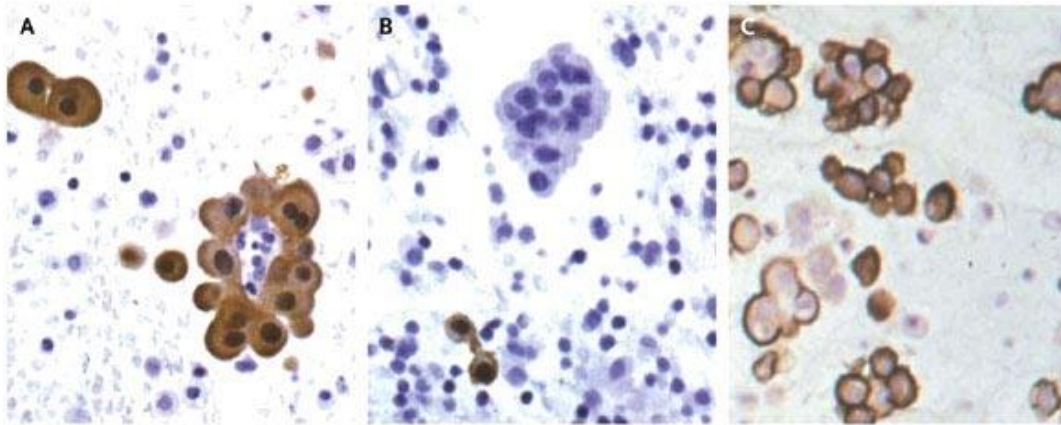


Figure 6. Analyse cytologique.

a) Echantillon de liquide pleural de mésothéliome présentant un marquage positif pour la calrétinine. b) Echantillon de liquide pleural d'adénocarcinome présentant un marquage négatif à l'exception de quelques cellules mésothéliales. c) Marquage CA15-3 de la membrane des cellules, indiquant la présence d'un mésothéliome malin. Tiré de : Robinson, B. W. *et al.* Advances in malignant mesothelioma. N Engl J Med. 2005 [60].

6.3 L'analyse immuno-histochimique

Le diagnostic du mésothéliome repose essentiellement sur l'histologie. Pour cela, il est indispensable de réaliser une biopsie qui permet d'avoir accès à la fois aux tissus suspects et sains. L'utilisation des techniques d'immuno-histochimie a permis d'améliorer le diagnostic et demeure aujourd'hui incontournable. Elle permet une différenciation nette entre le MPM et d'autres métastases, notamment issues d'adénocarcinomes pulmonaires.

Un panel d'anticorps (tableau 1) a été mis en place par la société européenne des maladies respiratoires (ERS) et la société européenne des chirurgiens thoraciques (ESTS) ; il comprend des anticorps ciblant des marqueurs spécifiques de ces deux types de cancers. Afin de valider le diagnostic, il faut identifier au moins deux marqueurs positifs pour le MPM et deux marqueurs négatifs [61].

Marqueur	Mésothéliome	Poumon
Calrétinine	Positif (nucléaire et cytoplasmique, 80-100%)	Négatif (5-10%)
Keratine CK5/6	Positif (cytoplasmique, 60-100%)	Négatif (2-10%)
WT1	Positif (nucléaire, 43-93%)	Négatif (0%)
EMA	Positif (membranaire, 60-100%)	Positif (cytoplasmique, 70-100%)
Podoplanine	Positif (membranaire, 80-100%)	Négatif (5%)
CEA monoclonale	Négatif (0%)	Positif (cytoplasmique, 50-100%)
CD15	Négatif (0%)	Positif (membranaire, 50-70%)
Ber-EP4	Négatif (20%)	Positif (membranaire, 95-100%)
TTF-1	Négatif (0%)	Positif (nucléaire, 70-95%)
B72.3	Négatif (1%)	Positif (cytoplasmique, 70-85%)

Tableau 1. Marqueurs immuno-histochimiques utilisés pour la distinction entre le mésothéliome et l'adénocarcinome pulmonaire.

WT-1 : Wilms tumor protein, EMA : Epithelial membrane antigen, CEA : carcinoembryonic antigen, TTF-1 : thyroid transcription factor-1. Adapté de : Scherpereel, A. *et al.* Guidelines of the European Respiratory Society and the European Society of Thoracic Surgeons for the management of malignant pleural mesothelioma. Eur Respir J. 2010 [61].

6.4 Les biomarqueurs solubles

Les prélèvements de sang et de liquide pleural chez les patients présentent un intérêt important dans le diagnostic du mésothéliome. En effet, plusieurs biomarqueurs solubles peuvent être recherchés pour le diagnostic de ce type de cancer.

La mésothéline est le principal marqueur décrit dans la littérature. Elle se trouve sous sa forme soluble dans le sérum, SMRP (Serum mesothelin-related peptid). Le taux de SMRP est élevé chez 84% des patients atteints de mésothéliome malin tandis qu'il est inférieur à 2% chez les patients souffrant d'autres maladies pulmonaires ou pleurales [62]. L'expression de cette protéine augmente avec la progression du cancer et diminue avec sa régression ou après une résection de la tumeur. Par conséquent elle peut être très utile dans le suivi du cancer et de son traitement. La SMRP peut aussi être dosée dans les effusions pleurales, ce qui est un atout pour le diagnostic du MPM [63].

Un autre biomarqueur est l'ostéopontine (OPN), une glycoprotéine surexprimée dans plusieurs types de cancers et impliquée dans les interactions avec la matrice extracellulaire. L'OPN a été, elle aussi, trouvée surexprimée dans le sérum des patients atteints de MPM, en particulier à un stade précoce (stade I). Cette glycoprotéine peut alors être un marqueur pour le dépistage précoce de ce type de cancer [64].

Une étude réalisée récemment sur 13 patients atteints de MPM et sur 45 autres présentant des maladies liées à l'exposition de l'amiante a montré une augmentation significative de l'expression de HMGB1 sérique chez les patients de MPM [65]. Ceci suggère que la concentration sérique de HMGB1 pourrait être un marqueur utile pour le diagnostic du MPM.

Plusieurs autres marqueurs solubles ont aussi été étudiés, notamment le CA-125, un antigène tumoral présent chez la majorité des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire mais également dans le MPM [3], le MPF (Megakaryocyte Potentiating Factor) [66] et la fibuline-3 [67]. Enfin, notre équipe a pu mettre en évidence que l'analyse combinée de l'expression de trois protéines, CCL2, la galectine-3 et le collagène de type III (Col3A1), peut contribuer à améliorer le diagnostic différentiel entre le MPM et l'adénocarcinome pulmonaire [68]. L'équipe a aussi montré qu'une combinaison des marqueurs SMRP/CCL2/galectine-3 peut augmenter la sensibilité du diagnostic du MPM par rapport à la SMRP seule [34].

7. Classification anatomo-pathologique du MM

Selon l'organisation mondiale de la Santé (OMS), il existe 4 principaux sous-types de MM : épithélioïde, sarcomatoïde, biphasique, aussi appelé mixte, et desmoplastique.

7.1 Mésothéliome malin épithélioïde

Le MM épithélioïde est le sous-type le plus courant et représente environ 60% de tous les mésothéliomes [69]. Ces tumeurs contiennent des cellules polygonales, ovales ou cuboïdes qui imitent souvent les cellules mésothéliales réactives qui répondent à divers types de blessures. Elles possèdent un noyau peu atypique avec un cytoplasme éosinophile (figure 6.a). Le MM épithélioïde a le meilleur pronostic parmi les différents sous-types. Il a été associé à la plus longue médiane de survie comparé à celles des MM sarcomatoïde et biphasique [70]. De plus, bien que les approches chimiothérapeutiques soient limitées, ce sous-type a la meilleure réponse aux traitements existants [71]. Son diagnostic peut être établi par un marquage de la calrétinine suivi de WT-1 [69].

7.2 Mésothéliome malin sarcomatoïde

Le MM malin sarcomatoïde représente environ 10 à 20% des mésothéliomes [69]. Les cellules tumorales sont fusiformes, souvent organisées en faisceaux, et peuvent imiter les tumeurs mésenchymateuses malignes [72]. Son pronostic est très défavorable. Contrairement au sous-type épithélioïde, les cellules de MM sarcomatoïde possèdent des noyaux allongés avec un nucléole proéminent (figure 6.b). Elles ne sont généralement pas abondantes dans l'espace pleural ce qui rend leur diagnostic cytologique difficile. En raison d'un nombre de marqueurs positifs plus faibles, l'immunohistochimie a un rôle plus restreint pour le diagnostic du MM sarcomatoïde que pour celui de l'épithélioïde [69].

7.3 Mésothéliome biphasique

Le sous-type biphasique correspond à un mélange de cellules épithélioïdes et sarcomatoïdes (figure 6.c). Le composant minoritaire doit former au moins 10% de la tumeur. Ce sous-type peut représenter jusqu'à 30% des mésothéliomes [73]. Son pronostic est classé entre l'épithélioïde et le sarcomatoïde.

7.4 Mésothéliome desmoplastique

Ce dernier sous-type est le plus agressif mais il ne représente que seulement 2% des mésothéliomes. Le mésothéliome desmoplastique est en fait formé par des MPM sarcomatoïdes riches en tissus fibreux collagéniques (figure 6.d). Lors du diagnostic, il peut être confondu avec une pleurésie (inflammation de la plèvre), c'est pour cela il est nécessaire de chercher attentivement les critères de malignités tels que la nécrose, le marquage positif des cellules sarcomatoïdes pour la vimentine et la desmine, l'invasion du tissu adipeux et les métastases à distance.

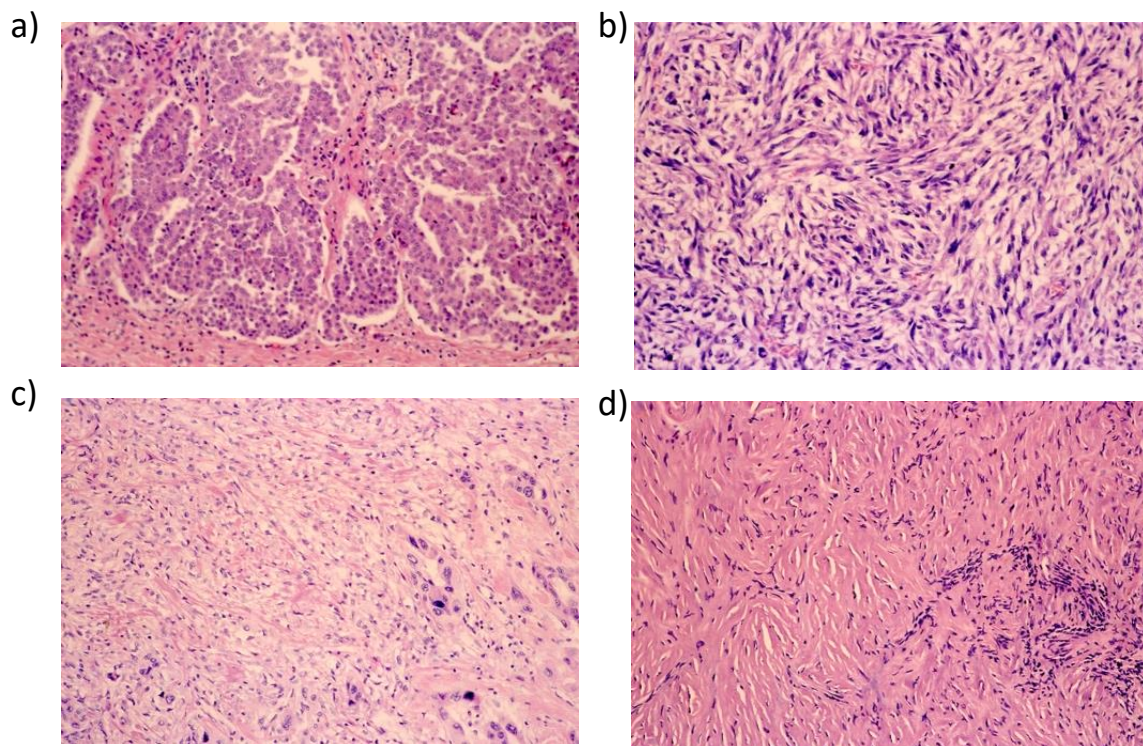


Figure 6. Marquage HE (hématoxyline, éosine) des cellules mésothéliales malignes.

a) Mésothéliome malin épithélioïde. b) Mésothéliome malin sarcomatoïde formé par des faisceaux de cellules fusiformes. c) Mésothéliome malin biphasique. d) Mésothéliome malin desmoplastique. Tiré de : Inai, K. Pathology of mesothelioma. Environ Health Prev Med. 2008. [74].

8. Prise en charge thérapeutique

Il n'existe, à ce jour, aucun traitement curatif pour le MM. Les modalités du traitement dépendent largement de l'état général du patient, de son âge, du stade du cancer et de son sous-type histologique. Le patient doit être pris en charge par une équipe expérimentée et pluridisciplinaire comportant des chirurgiens thoraciques, des pneumologues, des radiologues et

des oncologues afin de définir le ou les traitements appropriés. Il existe quatre approches majeures : la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie et le traitement multimodal. Toutefois, face à la faible efficacité de ces approches, des nouvelles alternatives thérapeutiques sont en cours de développement.

8.1 Chirurgie

Le traitement chirurgical s'effectue occasionnellement chez des patients soigneusement sélectionnés dans le but de réséquer toute la tumeur visible. Nous distinguons deux types de chirurgie : la pleurectomie / décortication (P/D) et la pneumonectomie extrapleurale (PEP).

La P/D consiste à éliminer toute la plèvre viscérale et pariétale afin de diminuer les douleurs thoraciques et d'améliorer la respiration, réduite lors d'un MM. La PEP est une résection complète du bloc pulmonaire, viscéral et pariétal allant jusqu'au péricarde et au diaphragme. Compte-tenu de sa lourdeur, l'application de cette approche est restreinte à quelques patients de moins de 60 ans ayant un état général parfait, un MM de sous-type épithélioïde et un stade précoce. La P/D semble être plus sûre que la pneumonectomie PEP. Elle est associée à moins de morbidité et de mortalité post-opératoire (environ 4% contre 12,5% pour la PEP) [75, 76]. Cependant, la chirurgie seule n'apporte pas un réel bénéfice. Elle est souvent accompagnée de chimiothérapie ou de radiothérapie dans le cadre d'approches multimodales.

8.2 Chimiothérapie

La plupart des patients atteints de MPM ne sont pas candidats à une chirurgie agressive en raison de l'étendue de la maladie ou d'un mauvais état général. Pour cela, la chimiothérapie reste l'option de traitement la plus raisonnable pour ce type de cancer. Une combinaison de drogues induit en général une réponse plus efficace qu'une administration d'un seul agent chimiothérapeutique. En effet une étude clinique randomisée de phase III a montré que la chimiothérapie combinée, basée sur les deux drogues, cisplatine (agent alkylant) et pemetrexed (anti-folate), était associée à une augmentation de la survie chez les patients [77]. La médiane de survie globale des individus traités par cisplatine-pemetrexed (12,1 mois) était significativement plus longue que celle des patients recevant du cisplatine seul (9,3 mois). Suite à ces résultats, la

combinaison de ces deux drogues est devenue le traitement de base de ce cancer [78]. Toutefois, une administration de suppléments (acide folique et vitamine B12) est recommandée pendant le traitement afin de diminuer la toxicité ainsi que les effets secondaires associés, tels que nausées, vomissements, diarrhée et fatigue.

Une étude similaire comparant la combinaison cisplatine-raltitrexed, un autre anti-folate, à l'administration de cisplatine seul a montré, elle aussi, que la combinaison thérapeutique est en faveur d'une amélioration de survie (11,4 mois versus 8,8 mois) [79].

Hormis la combinaison cisplatine / anti-folates, plusieurs essais de combinaison avec le cisplatine ont été réalisés : doxorubicine, gemcitabine, vinorelbine. Ces combinaisons ont donné des résultats intéressants mais restent moins efficaces que ceux du traitement de référence [80].

8.3 Radiothérapie

La radiothérapie est souvent utilisée dans le cadre d'un traitement multimodal, après par exemple la chirurgie radicale PEP dans le but de diminuer le risque de récurrence locale [81] et de soulager les douleurs thoraciques. Elle n'est généralement pas utilisée seule du fait que le mésothéliome n'est pas très sensible à la radiothérapie [82] et que la localisation de la tumeur, très proche du cœur et des poumons, peut causer des dommages collatéraux sévères en cas d'irradiation [83].

8.4 Traitement multimodal

Après une chirurgie (PEP ou P/D), les taux de récurrences locales et à distance sont en général très élevés. Pour cela, des stratégies de traitements ont été développées afin de consolider le contrôle local de la chirurgie. Le traitement tri-modal repose sur la combinaison de la chimiothérapie, de la chirurgie (PEP) et de la radiothérapie post-chirurgicale. Plusieurs études ont montré le bénéfice de ce traitement avec une amélioration de la médiane de survie de 21.9 mois [84]. Toutefois, ce traitement est très lourd et n'est applicable qu'à des patients en bon état général et à un stade très précoce de la maladie [85, 86].

8.5 Alternatives thérapeutiques

8.5.1 Immunothérapie

L'immunothérapie est l'une des approches les plus prometteuses pour le traitement des cancers. Son objectif est de favoriser la reconnaissance des cellules tumorales par les cellules du système immunitaire, d'activer leur cytotoxicité en ciblant des antigènes spécifiques des cellules cancéreuses et de générer une mémoire immunologique pour assurer une rémission à long terme. Le fait que le mésothéliome soit un cancer fortement infiltré par des cellules immunitaires, notamment des lymphocytes T, a généré un fort intérêt pour diverses applications immunothérapeutiques.

a. Cytokines

De nombreuses études ont évalué la thérapie par cytokines dans le traitement du MPM. L'administration intraveineuse, sous-cutanée ou intrapleurale d'IL-2 a ainsi montré des effets sur la régression tumorale [87, 88]. Dans un essai clinique de phase I réalisé sur 89 patients atteints de MPM au stade précoce, une administration intrapleurale d'IFN- γ a montré un bénéfice clinique avec un taux de réponse global de 20% [89]. Cependant, cette technique a été abandonnée en raison d'une toxicité excessive. Des essais évaluant l'injection d'un adénovirus codant pour l'IFN- β (Ad-IFN- β) ou l'IFN- α 2b (Ad-IFN- α 2b) suggèrent que ces deux cytokines ont un potentiel thérapeutique pour le MPM. Serman et ses collègues ont rapporté que le traitement intrapleural par Ad-IFN- β ou Ad-IFN- α 2b induit des réponses immunitaires anti-tumorales chez la majorité des patients atteints de MPM et d'autres tumeurs malignes pleurales [90, 91]. Toutefois cette réponse a été principalement observée chez les patients ayant un cancer à un stade précoce et la production d'anticorps neutralisants anti-adénovirus a diminué l'efficacité d'injections répétées. Dans une étude plus récente, cette même équipe a testé le traitement combiné de l'Ad-IFN- α 2b avec chimiothérapie et des résultats très prometteurs ont été soulignés avec une amélioration du taux de survie chez les patients ayant reçu la thérapie combinée [92].

Une autre approche consiste en l'utilisation de la protéine chimérique SS1P. Il s'agit d'une immunotoxine recombinante constituée d'un fragment variable anti-mésothéline lié à une portion d'exotoxine de *Pseudomonas* [93]. Un essai clinique de phase I, réalisé sur 33 patients, a montré une réponse anti-tumorale partielle chez 4 patients et une stabilisation de la maladie chez les 19 restants [94]. Bien que ces résultats soient encourageants, il s'est rapidement avéré que la plupart des patients étaient capables de développer des anticorps anti-toxine à la fin du premier cycle de traitement. Pour cela, la SS1P est maintenant administrée avec la pentostatine ou la

cyclophosphamide, des drogues qui retardent la formation des anticorps et améliorent donc la réponse clinique [93].

b. Transfert adoptif de lymphocytes T

Plusieurs équipes se sont intéressées à la technique du transfert adoptif de lymphocytes T génétiquement modifiés exprimant un récepteur d'antigène chimérique (CARs) qui cible des antigènes spécifiquement exprimés à la surface des cellules tumorales. Des cellules T réorientées contre la mésothéline ont ainsi été développées et ont montré des activités anti-tumorales *in vitro* et *in vivo* [95]. Des cellules T CARs ont été aussi générées contre la protéine d'activation des fibroblastes (FAP), un antigène fréquemment exprimé dans tous les sous-types du MM [96]. Cette approche a elle aussi montré son efficacité *in vitro* et *in vivo*. Actuellement, trois études de phase I chez des patients atteints de MPM sont en cours pour l'évaluation de la sécurité de cette approche et des doses efficaces pour les T CARs anti-mésothéline et anti-FAP (ClinicalTrials.gov, identifiants NCT01722149, NCT01355965, NCT01583686).

c. Vaccins thérapeutiques

Les vaccins thérapeutiques contre le cancer nécessitent une présentation efficace de l'antigène. La stratégie la plus fréquente est basée sur l'utilisation des cellules dendritiques (dendritic cells, DCs) chargées d'antigènes associés à une tumeur. Dans un essai de phase I sur 10 patients atteints de MPM, la vaccination par des DCs autologues chargées avec des lysats de cellules tumorales a permis d'induire une immunité anti-tumorale spécifique chez certains patients [97]. Cependant, aucune corrélation entre les réponses immunitaires et les résultats cliniques n'a été observée. Dans une étude clinique plus récente, cette même équipe a démontré que l'utilisation de cyclophosphamide permettait d'améliorer l'efficacité de leur approche [98]. Une autre étude clinique de phase I/II actuellement en cours, MESODEC, repose sur un traitement par des DCs chargées avec l'antigène WT1. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'induction de la réponse immunitaire et de montrer la faisabilité et la sécurité de la vaccination DCs ciblée contre WT1 en association avec la chimiothérapie (NCT02649829). Une autre stratégie axée sur WT1 est la vaccination des patients avec des peptides synthétiques dérivés de la séquence protéique du WT1. Une étude pilote a montré que le vaccin cause une toxicité minimale et induit des réponses

immunitaires contre WT1 chez une forte proportion de patients [99]. À l'heure actuelle, deux études de phase II portant sur la vaccination WT1 sont en cours. Dans les deux études, la vaccination WT1, associée au GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor), est administrée en adjuvant chez des patients ayant déjà reçu une thérapie multimodale pour le MM (NCT01890980 et NCT01265433).

d. Inhibition des points de contrôle immunitaires

Afin d'empêcher l'auto-immunité, l'activation et la fonction des lymphocytes T sont contrôlées par plusieurs points de contrôle immunitaires dont l'antigène associé aux lymphocytes cytotoxiques 4 (CTLA-4) et le PD-1. Le ciblage des points de contrôle immunitaire, avec des anticorps monoclonaux immunomodulateurs, s'est révélé efficace chez les patients pour une variété de tumeurs solides dont le mésothéliome. Une étude récente de phase II a évalué l'anticorps monoclonal anti-CTLA-4 tremelimumab (AstraZeneca) chez 29 patients atteints de mésothéliome malin et résistants à la chimiothérapie. La médiane de survie globale était de 11,3 mois et 52% des patients ont montré un contrôle de la maladie [100]. Cependant, une étude multicentrique comprenant 571 patients atteints de MM pleuraux ou péritonéaux non résécables n'a montré aucune différence significative de survie globale entre le groupe traité et le groupe placebo (médianes de survie de respectivement 7,7 mois et 7,3) [101].

En outre, des anticorps monoclonaux dirigés contre PD-L1 ou PD1 sont également actuellement étudiés dans des essais de phase I / II pour le MPM. En effet, plusieurs études ont montré que ces deux protéines étaient hautement exprimées dans le MPM et que cette expression était corrélée au pire pronostic [102, 103]. Alley *et al.* ont récemment signalé des résultats prometteurs de leur essai de phase I / II sur le pembrolizumab, un anticorps monoclonal contre PD1, chez des patients de MPM en deuxième ligne. Chez les 25 patients avec expression de PD1, il a été rapporté un taux de réponse global de 28% (7 patients) alors que 12 patients ont présenté une stabilisation de la maladie [104].

8.5.2 Thérapies ciblées

Les thérapies ciblées consistent principalement en l'inhibition des voies de prolifération ou d'angiogenèse actives dans le MPM par l'administration de molécules chimiques ou d'anticorps.

L'EGFR est primordial pour la prolifération, la migration et la survie du mésothéliome. Bien que l'inhibition *in vitro* de ce récepteur montre une diminution du développement tumoral [40], l'étude de phase II chez des patients de MPM n'a pas montré d'efficacité de l'elotinib et du gefitinib, des inhibiteurs de la tyrosine kinase de l'EGFR, malgré une surexpression de l'EGFR dans la plupart des cas [105, 106]. La faible prévalence des mutations activatrices de l'EGFR peut expliquer le manque d'efficacité clinique. Un essai de phase II évalue actuellement l'erlotinib chez des patients atteints de mésothéliome péritonéal portant des mutations EGFR (NCT01592383).

L'IGF (Insulin-like growth factor 1) ainsi que ses récepteurs IGF-1R et IGF-2R sont exprimés dans le MPM et sont associés à la croissance et à la motilité cellulaire [107]. L'efficacité du cixutumumab, un anticorps monoclonal humain contre l'IGF-1R, a été testée sur des cellules tumorales de passage précoce obtenues à partir de patients. Une forte corrélation a été établie entre le niveau d'expression de l'IGF-1R et l'activité anti-tumorale du cixutumumab. Actuellement, l'évaluation de ces résultats est l'objectif d'un essai de phase II étudiant le cixutumumab en monothérapie de seconde ligne chez des patients atteints de mésothéliome (NCT01160458).

L'expression du VEGF est élevée dans la plupart des mésothéliomes et joue un rôle important dans l'angiogenèse. Par conséquent, différents inhibiteurs des récepteurs au VEGF ont été testés dans des études de phase II tels que le sunitinib, le vatalanib et le cediranib. Malheureusement, aucun d'entre eux n'a amélioré la survie globale [108]. En revanche, Le bevacizumab, qui est un anticorps anti-VEGF, a récemment été testé dans un essai de phase III en association avec le cisplatine et le pemetrexed. Une augmentation de la survie globale a été observée chez les patients ayant reçu les trois traitements (18,8 mois) en comparaison avec les patients n'ayant reçu que la combinaison cisplatine/pemetrexed (16,1 mois) [109].

8.5.3 Agents épigénétiques

La régulation épigénétique des gènes suppresseurs de tumeur est un mécanisme important dans le processus tumoral. Les protéines de la famille des histones désacétylases (HDAC) inhibent la transcription de l'ADN par désacétylation des histones, et leur surexpression ou fonction aberrantes ont été trouvées dans de nombreux cancers, y compris le mésothéliome [110].

Le vorinostat[®] (ou SAHA, Suberoylanilide hydroxamic acid) est l'un des inhibiteurs HDAC (iHDAC) les plus étudiés et est actuellement approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) pour le traitement du lymphome T cutané. Notre équipe a étudié l'efficacité de cet inhibiteur dans un modèle immunocompétent de MM murin (AK7). Les résultats obtenus montrent que le traitement de souris porteuses de tumeurs réduit la masse tumorale et induit une infiltration lymphocytaire modérée. Cependant, le traitement n'empêche pas le développement de la tumeur. En revanche, l'immunisation des souris par des cellules AK7 pré-traitées avec le SAHA avant la transplantation de cellules AK7 vivantes, induit une réponse immunitaire spécifique avec arrêt du développement tumoral. Une augmentation de la proportion des lymphocytes CD3⁺ CD8⁺ est observée dans la cavité péritonéale ainsi que des foyers de cellules T CD8⁺ dans l'omentum à proximité des lobules pancréatiques [111].

Le premier essai de phase I du vorinostat[®] sur le MM comprenait 13 patients dont deux ont montré une réponse partielle (15,4%) [112]. Cet essai a conduit à une étude multicentrique de phase III du vorinostat[®] sur des patients ayant progressé après une première ligne de chimiothérapie basée sur le pemetrexed. Malgré les énormes efforts de collaboration, cet important essai randomisé comprenant 660 patients n'a pas montré de bénéfice sur la survie globale (30,7 semaines versus 27,1 semaines) [113]. Le valproate est un autre iHDAC. Un essai de phase II utilisant cet iHDAC en combinaison avec la doxorubicine a montré des résultats prometteurs pour le traitement des patients porteurs de MM sur lesquels la chimiothérapie avait échoué [114].

Notre équipe travaille sur l'amélioration de la délivrance spécifique des iHDACs. Pour cela des nanoparticules spécifiques ont été développées. Couplées à des iHDACs, elles permettent de cibler la tumeur et d'y amener spécifiquement ces molécules. *In vivo*, sur des modèles orthotopiques de MM, cette approche a montré que l'utilisation d'un nano-vecteur conduit à une délivrance optimisée des iHDACs dans la tumeur et à une amélioration de leurs propriétés anti-tumorales. Une réduction de 80% de la masse tumorale a été observée avec une absence de toxicité comparé au groupe recevant l'iHDAC seul où aucun effet thérapeutique n'a été souligné [115]. D'autre part, notre équipe a aussi étudié la combinaison des iHDAC avec un agent hypométhylant, le 5-aza-2'-déoxycytidine (5-azaCdR). *In vivo*, la combinaison valproate/5-azaCdR inhibe la croissance tumorale et induit l'expression d'antigènes tumoraux, favorisant ainsi une infiltration des lymphocytes T et une réponse immunitaire dirigée contre les cellules tumorales [116].

CONCLUSION

Le mésothéliome est un cancer très agressif causé par l'exposition aux fibres d'amiante. Son pronostic très défavorable, avec une médiane de survie inférieure à 12 mois, est dû à un diagnostic établi à un stade très avancé et à un manque d'efficacité des traitements. En effet, la chirurgie curative est généralement impossible dans ce type de cancer et la radiothérapie n'a apporté aucun bénéfice remarquable. Seule la chimiothérapie a pu améliorer très modestement la survie des patients, trois mois environ, en combinant le pemetrexed et le cisplatine. L'immunothérapie, basée sur la reconnaissance spécifique des antigènes tumoraux par les acteurs du système immunitaire, l'utilisation d'anticorps monoclonaux ou de lymphocytes T activés, est en cours d'évaluation dans des essais cliniques. Ainsi, en l'absence de stratégie thérapeutique efficace pour ce cancer, il est urgent de développer et d'évaluer de nouvelles approches innovantes, telles que la virothérapie anti-tumorale, et de mettre en place des modèles précliniques pertinents afin de déterminer l'efficacité des nouveaux traitements *in vivo*. Mon travail de thèse a ainsi consisté à essayer de répondre à ces difficultés.

II. Modèles précliniques de mésothéliome

Comme l'homme, de nombreuses autres espèces peuvent développer un mésothéliome après une exposition à des fibres d'amiante par inhalation, y compris les souris, les hamsters, les rats, les chèvres, les chevaux et les chiens [117]. Pour cette raison, les modèles animaux du MM ont été utilisés depuis des décennies pour évaluer la cancérogénicité des différents types de fibres d'amiante et pour étudier la physiopathologie de ce néoplasme agressif. Nous pouvons distinguer deux types de modèles : les modèles immunodéficients basés sur la transplantation de xénogreffes de MM humains (chez les souris nude ou NOD SCID) et les modèles immunocompétents obtenus après l'exposition prolongée de l'animal à des fibres d'amiante.

1. Modèles de xénogreffes

Dans ces modèles, des lignées cellulaires de mésothéliome humain sont injectées par voie sous-cutanée ou de façon orthotopique (intrapleurale / intrapéritonéale) dans des souches immunodéficientes de souris. Ils sont généralement utilisés afin d'évaluer des nouvelles stratégies thérapeutiques. Parmi ces modèles nous notons par exemple l'étude de l'efficacité de S-1, un agent anti-cancéreux, dans un modèle orthotopique chez des souris NOD SCID [118], l'évaluation de la combinaison du piroxicam et du cisplatine dans un modèle orthotopique de MM chez des souris nude [119] et l'évaluation de l'efficacité de la suramine, un inhibiteur des facteurs de croissance extracellulaires, comme agent potentiel pour la thérapie adjuvante [120]. Mossman et son équipe ont eux aussi utilisé des modèles de xénogreffes de MM péritonéal humain afin d'évaluer l'efficacité de la thérapie ciblée basée sur l'administration de doxorubicine dans des particules APMS (Acid-prepared mesoporous silica) présentant à leur surface des anticorps anti-mésothéline humaine. Ils ont pu démontrer que cette stratégie entraînait une plus grande efficacité chimiothérapeutique avec moins d'effets secondaires indésirables en comparaison de l'administration de doxorubicine seule [121]. De même, ces modèles ont été utilisés pour évaluer l'efficacité de certains traitements visant les voies mutées du MM, telle que la molécule RITA (Reactivation of p53 and Induction of Tumor cell Apoptosis) qui cible la voie apoptotique p53 [122].

Dans mes travaux de thèse, j'ai été amenée à utiliser ce modèle immunodéficient de xénogreffe chez les souris NOD SCID afin d'évaluer l'efficacité de la virothérapie anti-tumorale

basée sur l'utilisation du virus de la rougeole. Cependant, la limite majeure de ce type de modèle est l'absence d'un système immunitaire intact. Si les xénogreffes peuvent être pertinentes pour identifier l'efficacité de nouveaux médicaments, elles sont sans pertinence pour l'étude des stratégies immunothérapeutiques [117].

2. Modèles immunocompétents

Ces modèles obtenus suite à l'exposition aux fibres d'amiantes imitent bien le MM humain par la morphologie, les caractéristiques histologiques et la croissance. Comme pour les modèles de xénogreffes, les cellules obtenues peuvent être réinjectées par voie sous-cutanée ou en orthotopique. Afin de se rapprocher le plus possible des conditions observées en clinique, les modèles orthotopiques présentent l'avantage majeur par rapport aux xénogreffes sous-cutanées de prendre en compte le microenvironnement tumoral [123].

Plusieurs lignées ont été développées chez la souris depuis les années 1980, provenant de différentes souches : la lignée AK7 chez la souris C57BL/6, la lignée AB1 provenant des souris BALB/c et la lignée AC29 chez les souris CBA. Ces modèles ont servi principalement à l'étude de l'aspect immunitaire induit suite à un traitement donné. Le modèle AK7, utilisé par notre équipe, a servi par exemple à démontrer l'activation des cellules T cytotoxiques CD8⁺ suite à un traitement par une combinaison de drogues épigénétiques ou à une immunisation avec des cellules tumorales prétraitées [111, 116]. Il a été utilisé également pour l'amélioration du ciblage tumoral basé sur le transport de drogues dans des nanoparticules [124, 125].

Le modèle utilisant les cellules de mésothéliome murines AB1 a par exemple été utilisé par Mezzapelle *et al.* [126]. Dans une étude récente, cette équipe montre que l'injection de ces cellules dans des souris BALB/c induit le développement de tumeurs identiques des points de vue morphologique et histologique au MM humain et que ces tumeurs présentent une réponse similaire aux traitements. Comme chez l'homme, ces cellules répondent à la protéine exogène HMGB1 qui agit comme un chimio-attractant pour les leucocytes et un médiateur pro-inflammatoire. Fox *et al.* ont utilisé ce modèle ainsi que le modèle AC29 pour l'étude du mécanisme d'induction d'apoptose suite au traitement cisplatine / TNF- α [127]. Ils ont démontré que la combinaison de ces deux agents induit une diminution de la transcription du gène anti-apoptotique Bcl-xL dans les deux modèles *in vivo*.

Le modèle AC29 a aussi été utilisé par Friedlander *et al.* pour étudier l'efficacité d'une approche de thérapie génique avec le ligand de CD40 (CD40L) dans le MM. Cette équipe a montré que l'inoculation des souris CBA avec des cellules AC29 traitées *ex vivo* avec un adénovirus recombinant codant pour le CD40L murin (AdCD40L), ou l'administration intra-tumorale direct de cet adénovirus dans des souris porteuses de tumeurs, entraîne une suppression significative de la formation de la tumeur par rapport aux témoins. Cela est associé à un recrutement accru des cellules T CD8⁺ intra-tumorales. De plus, chez des souris porteuses de deux tumeurs sous-cutanées, le traitement de l'une des tumeurs avec AdCD40L a entraîné en parallèle une régression de la deuxième tumeur, suggérant une activation spécifique de lymphocytes T CD8⁺ [128]. Enfin, ce modèle a été utilisé dans une étude intéressante montrant l'effet synergique anti-tumoral du pemetrexed combiné au blocage des Treg en utilisant l'anticorps anti-CD25 PC61. Une augmentation de survie a été observée, associée à une diminution des Treg infiltrant la tumeur, une augmentation de la production d'IL-2, une maturation efficace des DCs et une augmentation d'infiltrats T CD3⁺CD8⁺IFN- γ ⁺ par rapport aux souris traitées avec le pemetrexed ou le blocage des Treg seuls [129].

Comparé à la souris, le rat présente une orthologie plus proche de l'homme [130] et sa grande taille permet des interventions chirurgicales, des injections de volume plus importantes et de prélever de nombreux échantillons sur un même individu. En plus de ces avantages, de nombreuses études ont montré que ce rongeur peut développer des mésothéliomes spontanés au niveau du péritoine et de la tunica vaginalis [131], à un âge moyen de 98,7 semaines [132]. Ces tumeurs ont été analysées en détail dans plusieurs études qui ont permis de conclure que des lignées cellulaires dérivées de ces tumeurs partagent les mêmes caractéristiques de développement que le MM chez l'humain [133].

Comme pour la souris, le modèle MM de rat peut être obtenu par exposition à des fibres d'amiante. Plusieurs équipes ont développé ces modèles dans leurs laboratoires depuis 1962, en utilisant plusieurs types de fibres d'amiante (amosite, chrysotile ou crocidolite) [134]. Les premiers modèles ont été induits chez des rats de souche Wistar par injection de fibres d'amiante en intrapleurale [135] ou intra-péritonéal [136]. Par la suite, des lignées de MM provenant de rats Fischer ont été caractérisées et commercialisées telles, par exemple II-14, II-45 et III-2 [137]. Ampollini *et al.* se sont servis de la lignée II-45 pour étudier l'efficacité d'une combinaison d'immuno-chimiothérapie sur des récidives du MM après chirurgie. Ils ont montré que l'administration post-chirurgicale de cisplatine associée à l'agent immunomodulateur CpG-ODN

(cytosine phosphate guanosine oligodeoxynucleotide) induit une réduction des récurrences du MM et une infiltration plus élevée du nombre des lymphocytes T CD8⁺ dans le tissu tumoral [138]. Dans une autre étude, cette lignée a été utilisée pour l'évaluation du rôle que joue la voie p38 MAPK (Mitogen-activated protein kinase) dans la prolifération du MM [139].

Notre équipe s'est aussi intéressée au développement de son propre modèle préclinique de MM chez le rat Fisher F344. Ce travail, qui a duré quatre ans, a abouti à l'établissement d'une biocollection de vingt-sept lignées cellulaires après exposition des rats à des fibres d'amiante administrées par voie péritonéale [140]. Parmi ces lignées, vingt-trois ont été classées comme pré-néoplasiques et quatre comme néoplasiques, capables de produire trois semaines après injection orthotopique des tumeurs dans la cavité péritonéale. Une étude de caractérisation de ces lignées, réalisée par Roulois *et al.* et publiée récemment, a montré que les lignées néoplasiques partageaient avec les lignées de MM humain des profils d'expression de nombreux gènes [141]. Ces cellules néoplasiques ont servi de base de travail à mon sujet de thèse. La lignée la plus agressive de cette biocollection, M5-T1, a permis l'évaluation du potentiel thérapeutique de l'injection intracavitaire de la curcumine contre le sous-type sarcomatoïde du MM. Le traitement de rats porteurs de tumeurs avec la curcumine a considérablement réduit la masse tumorale totale. Des foyers denses de lymphocytes T CD8⁺ ont été observés à la périphérie de petites masses tumorales résiduelles dans la cavité péritonéale. Ces masses tumorales présentaient une réduction significative de l'indice mitotique, de l'expression de l'IL-6 et de la vimentine par rapport aux tumeurs de rats non traités, attestant de l'efficacité du traitement [142].

CONCLUSION

Les modèles animaux sont un atout pour la compréhension de la biologie complexe du MM et l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques. Parmi ces modèles, ceux établis en orthotopique sur des souches de souris ou de rats immunocompétents sont les plus pertinents car ils prennent en compte le microenvironnement tumoral. Grâce à ces modèles, il a été possible d'identifier plusieurs voies impliquées dans la pathogenèse et l'agressivité de ce type de cancer telles que les voies de signalisation IGF-1, p38 MAPK et Wnt/ β -caténine [143]. L'expression de certains gènes tels que *Wt1* et *tgfb3* (Transforming Growth Factor Beta 3) a été mise en évidence comme pour le MM humain [143, 144]. Outre la ressemblance du microenvironnement tumoral avec celui trouvé chez l'homme, les modèles immunocompétents sont des modèles indispensables pour l'étude de la réponse immunitaire qui constitue la base des traitements contre le cancer en immunothérapie.

III. Virothérapie anti-tumorale

1. Principe

La virothérapie anti-tumorale est aujourd'hui l'une des stratégies thérapeutiques les plus prometteuses pour la lutte contre les cancers. Elle est devenue un centre d'intérêt dès les années 1910 au cours desquelles un premier cas de régression du cancer du col de l'utérus a été rapporté chez une patiente ayant reçu un vaccin atténué contre la rage [145]. Toutefois, il a fallu plusieurs années d'essais *in vitro* et *in vivo* avec une amélioration des connaissances sur le mode d'action des virus, leurs toxicités et leurs limites pour pouvoir envisager sérieusement leur utilisation en thérapie anti-tumorale. Ce n'est donc qu'en 1996 que le premier virus oncolytique génétiquement modifié, ONYX-015, fut utilisé dans un essai clinique de phase I pour le traitement du cancer du col de l'utérus [146].

Les virus oncolytiques sont caractérisés par leur capacité à infecter et tuer les cellules tumorales sans nuire aux cellules saines. En fait, plusieurs aberrations cellulaires surviennent au cours de la tumorigenèse. Les virus oncolytiques exploitent ces aberrations qui affectent par exemple l'expression, par les cellules tumorales, de molécules de surfaces utilisées comme récepteurs d'entrée du virus mais aussi des défauts dans des voies de signalisation dont la voie IFN de type I, premier mécanisme inné antiviral. En effet, il a été mis en évidence que cette voie était défectueuse dans la plupart des cancers [147], ce qui fait de la tumeur un lieu préférentiel de réplication virale, contrairement aux cellules saines dans lesquelles ce mécanisme demeure fonctionnel.

Certains virus présentent naturellement une capacité à cibler les cellules tumorales tandis que d'autres doivent être modifiés génétiquement afin d'améliorer leur sélectivité. Ces modifications consistent par exemple à orienter les virus vers des récepteurs exprimés à la surface des cellules tumorales, utiliser les protéases secrétées par les cellules cancéreuses comme cible pour l'activation du virus ou contrôler la réplication et la transcription virale par des promoteurs activables seulement dans les cellules tumorales [148, 149]. Une technique plus récente consiste en l'intégration, dans le génome du virus, de séquences reconnues par les microARN (micro Ribonucleic acid) exprimés dans les cellules saines [150]. D'autres modifications consistent à renforcer le pouvoir oncolytique des virus telles que l'insertion de gènes suicides capables d'induire l'apoptose, ou des gènes d'enzymes, comme la cytosine déaminase, capables de transformer des substrats non toxiques en cytotoxiques. Une autre stratégie consiste en l'insertion

de gènes activant la réponse immunitaire comme par exemple des cytokines (IL-2, IL-12, IL-15, GM-CSF) ; des protéines de choc thermique (heat shock protein, HSP) en particulier HSP70 qui active les cellules dendritiques [151] ; des antigènes tumoraux et des molécules co-stimulatrices des lymphocytes T telles que CD40L [152].

2. Principaux virus oncolytiques

Les virus oncolytiques peuvent être des virus à ADN ou à ARN, simple ou double brin (tableaux II et III).

2.1 Virus à ADN

2.1.1 Virus de la vaccine

Le virus de la vaccine (VV) est un membre de la famille des poxvirus qui possède un génome à ADN double brin pouvant aller jusqu'à 190 kb (tableau II). Compte-tenu de sa forte immunogénicité et de la capacité du génome de la vaccine à accepter de grands transgènes (25 kb), les souches oncolytiques de ce virus ont été utilisées pour exprimer des antigènes tumoraux, des molécules co-stimulatrices pour les lymphocytes T et des cytokines inflammatoires. Un virus de la vaccine codant pour la molécule co-stimulatrice B7.1 a montré son efficacité dans un essai clinique de phase I chez des patients atteints de mélanome. Le JX-594 (Pexa-vec), un autre virus de la vaccine codant pour le gène GM-CSF, a été lui aussi testé dans des essais cliniques de phase I, II et III pour plusieurs types de cancers avec des résultats très encourageants [153, 154]. Ce virus, qui dérive de la souche vaccinale Wyeth, est délété pour la thymidine kinase (TK) qui est nécessaire à sa réplication, mais cette enzyme est exprimée dans une majorité de cellules tumorales.

D'autres VV ont aussi montré leur efficacité dans des modèles orthotopiques de mésothéliome [155, 156]. Récemment, la société Transgene (Illkirch Graffenstaden, France) a créé un virus de la vaccine dérivé de la souche vaccinale Copenhagen délétée des gènes TK et de la ribonucléotide réductase (RR). Ce virus ne peut se répliquer que dans les cellules en prolifération, telles que les cellules tumorales, qui possèdent une forte activité constitutive TK et RR. Intéressés

par ce virus, nous l'avons récemment testé pour la première fois dans nos lignées de MM humains et les résultats sont présentés dans cette thèse.

Nous pouvons aussi noter qu'une étude clinique de phase I, basée sur l'injection intrapleurale du GL-ONC1 (un virus de la vaccine délété pour la TK et exprimant la luciférase) chez des patients ayant des épanchements pleuraux, est aussi en cours de réalisation (NCT01766739).

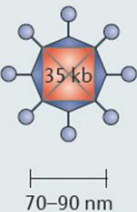
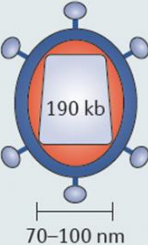
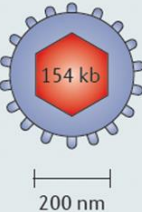
				
Nom	Adénovirus	Virus de la vaccine	Herpèsvirus	Parvovirus
Famille	Adenoviridae	Poxviridae	Herpesviridae	Parvoviridae
Classification	Groupe I : dsDNA	Groupe I : dsDNA	Groupe I : dsDNA	Groupe II : ssDNA
Récepteur/s	CAR	Non identifié	HVEM, nectine-1, nectine-2	Résidus d'acide sialique
Réplication	Noyau/Cytoplasme	Cytoplasme	Noyau/Cytoplasme	Noyau/Cytoplasme

Tableau II. Virus oncolytiques à ADN

dsDNA : double-stranded DNA, ADN double brin ; ssDNA : single-stranded DNA, ADN simple brin ; CAR : coxsackie-adenovirus receptor ; HVEM : herpesvirus entry mediator. Tiré de: Kaufman, H. *et al.* Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. Nat Rev Drug Discov. 2015 [157].

2.1.2 Adénovirus

Les adénovirus sont des virus à ADN double brin non enveloppés lytiques avec une capside d'environ 90nm et un génome allant de 30 à 38 kb (tableau II). Ayant un tropisme tissulaire large et possédant la capacité d'infecter une grande variété de cellules quiescentes ou en division, les adénovirus sont parmi les vecteurs viraux les plus étudiés pour la thérapie génique et la virothérapie anti-tumorale. Ils peuvent être produits à des titres élevés et leurs particules virales

présentent une stabilité physico-chimique importante. Les bonnes connaissances sur leur biologie offrent de nombreuses possibilités de modifications génétiques [158].

Le virus ONYX-015, renommé H101, a été le premier virus oncolytique génétiquement modifié à être testé cliniquement dès 1996. Il a été conçu pour se répliquer sélectivement dans des cellules déficientes pour p53 du fait d'une délétion dans le gène E1B. Son utilisation chez l'homme a été approuvée en 2006 en Chine [159], mais son développement clinique a été interrompu depuis 2000 aux Etats-Unis et en Europe en raison d'un manque d'efficacité.

Plusieurs adénovirus modifiés sont actuellement en essais cliniques. Le DNX-2401, conçu pour se répliquer dans des cellules déficientes pour la protéine rétinoblastome (Rb), est utilisé pour le traitement du glioblastome et du gliosarcome. Le CG0070, également conçu pour se répliquer dans des cellules déficientes en Rb et contenant le gène GM-CSF, est utilisé pour le traitement du cancer de la vessie. Enfin l'OBP-301, contenant le promoteur de la transcriptase inverse de la télomérase humaine, est utilisé pour le traitement du carcinome hépatocellulaire [146].

Plusieurs approches ont été développées pour exploiter les altérations tumorales qui pourraient favoriser une réplication spécifique des adénovirus dans les cellules de MM par rapport aux tissus sains environnants. Ces approches s'appuient principalement sur l'utilisation d'adénovirus modifiés possédant des promoteurs tels que ceux de la survivine, de la protéine inhibitrice 1 CREBBP/EP300 et de la télomérase qui peuvent être activés dans les cellules de MM [160]. L'insertion de gènes codant pour des molécules suppressives de tumeurs ou immunostimulatrices a aussi été développée contre le MM. Par exemple, un adénovirus codant pour le gène p53 a montré une activation des voies apoptotiques dans les cellules de MM, de même qu'une réexpression des gènes suppresseurs de tumeurs p14 et p16 qui sont généralement absents dans ce type de cancer. Ce virus a montré sa capacité à induire la régression de tumeurs dans des modèles animaux [160].

2.1.3 *Herpèsvirus*

Les herpès simplex virus (HSV) sont des virus à ADN double brin avec un génome de 152 kb (tableau II). Ils ont des propriétés oncolytiques intéressantes mais peuvent être pathogènes, en induisant des lésions cutanées et en infectant parfois les nerfs périphériques. C'est pourquoi la modification génétique de ces virus est nécessaire dans le cadre d'une virothérapie. Le Talimogene

laherparepvec (T-VEC), aussi connu sous le nom d'OncoVEX^{GM-CSF}, est l'un des HSV les plus étudiés. Afin de réduire sa pathogénèse tout en améliorant l'infection sélective des cellules tumorales, le T-VEC présente des délétions du gène ICP34.5 (Infected cell protein 34.5), qui code pour un facteur de neurovirulence, ainsi que de l'inhibiteur de la présentation d'antigènes ICP47. Le T-VEC est aussi recombinant pour le GM-CSF afin d'améliorer la réponse immunitaire anti-tumorale. Dans un essai clinique de phase II chez des patients atteints de mélanome, ce virus a montré une activité anti-tumorale locale et à distance importante après injection intratumorale [161]. Grâce aux résultats positifs d'un essai clinique randomisé de phase III chez 436 patients atteints de mélanomes métastatiques non opérables de stade IIIB, IIIC et IV [162], le T-VEC devient le premier virus oncolytique à être approuvé le 27 octobre 2015 par la FDA aux Etats-Unis pour le traitement du mélanome métastatique. Il sera ensuite approuvé par la Commission Européenne quelques mois plus tard.

Le T-VEC n'a pas encore été utilisé chez les patients atteints de MM, mais d'autres souches de HSV ont été étudiées pour leur capacité à cibler et tuer spécifiquement les cellules de mésothéliome. Depuis 1997, le HSV-1716 a démontré son efficacité à éliminer les cellules humaines de MM *in vitro* et *in vivo* dans des souris immunodéficientes. Aujourd'hui, ce virus est en essai clinique de phase I/II chez des patients atteints de MM. Le but de l'étude, qui vient de se terminer mais n'est pas encore publiée, est d'évaluer la sécurité et les effets biologiques des administrations simples et multiples de HSV-1716 dans le traitement du mésothéliome pleural malin (NCT01721018).

2.1.4 Parvovirus

Les parvovirus, contrairement aux virus cités ci-dessus, sont des virus à ADN simple brin ayant un génome de seulement 5 kb (tableau II). Ils présentent une sélectivité pour les cellules ayant la voie de signalisation p53 mutée ou inactive. Grâce à sa capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique, le parvovirus H1-PV a été utilisé dans des essais cliniques pour le traitement du glioblastome multiforme (GBM) [163]. Ce virus peut induire une réponse immunitaire contre le GBM via l'expression de plusieurs cytokines inflammatoires comme l'IFN- γ et la libération d'antigènes tumoraux [164]. A ce jour, aucune étude utilisant un parvovirus n'a été réalisée pour le traitement du mésothéliome.

2.2 Virus à ARN

2.2.1 Réovirus

Les réovirus sont des virus non enveloppés à ARN double brin (tableau III). Dans les cellules saines, la production des ARN viraux induit l'activation de la voie PKR (protéine kinase R) puis le blocage de la réplication du virus. De ce fait, les réovirus ciblent préférentiellement les cancers présentant une mutation de cette voie. Le tropisme naturel de ces virus pour les cellules transformées a conduit à de nombreux essais cliniques contre plusieurs types de cancer, y compris le gliome, le mélanome, le cancer de l'ovaire et le cancer colorectal [157]. Jusqu'à présent, un seul patient atteint de MM métastatique a été inclus dans un essai clinique utilisant le réovirus. Les cellules tumorales infectées ont montré une forte production de protéines virales accompagnée d'une diminution de la taille d'un ganglion lymphatique envahi par les cellules cancéreuses, après six cycles de combinaisons docétaxel / réovirus [165].

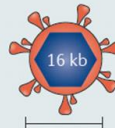
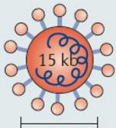
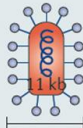
							
Nom	Réovirus	Coxsackievirus	Seneca Valley virus	Poliovirus	Virus de la rougeole	Virus de la maladie Newcastle	Virus de la stomatite vésiculaire
Famille	Reoviridae	Picornaviridae	Picornaviridae	Picornaviridae	Paramyxoviridae	Paramyxoviridae	Rhabdoviridae
Classification	Groupe III : dsRNA	Groupe IV : ssRNA	Groupe IV : ss(+) RNA	Groupe IV : ss(+) RNA	Groupe V : ss(-) RNA	Groupe V : ss(-) RNA	Groupe V : ss(-) RNA
Récepteurs	Non identifié	CAR/ICAM-1 /DAF	Non identifié	CD155	SLAM /CD46 /nectine-4	Non identifié	LDLR
Réplication	Cytoplasme	Cytoplasme	Cytoplasme	Cytoplasme	Cytoplasme	Cytoplasme	Cytoplasme

Tableau III. Virus oncolytiques à ARN

dsRNA : double-stranded RNA, ARN double brin ; ss(+)RNA : positive single-stranded RNA, ARN simple brin positif ; ss(-)RNA : negative single-stranded RNA, ARN simple brin négatif ; CAR : coxsackie-adenovirus receptor ; DAF : decay accelerating factor ; ICAM-1 : intercellular adhesion molecule 1 ; LDLR : low-density lipoprotein receptor ; SLAM, signalling lymphocytic activation molecule. Tiré de: Kaufman, H. *et al.* Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. Nat Rev Drug Discov. 2015 [157].

2.2.2 *Virus de la maladie de Newcastle*

Le virus de la maladie de Newcastle (Newcastle Disease Virus, NDV) est un virus à ARN simple brin de la famille des *Paramyxoviridae* (tableau III). Etant très sensible à la voie IFN de type I, le NDV cible de préférence les cellules cancéreuses. Une fois dans la cellule, il induit l'apoptose et active directement le système immunitaire inné grâce à une augmentation de la production de cytokines (CCL5, IL-12 et GM-CSF) et une amélioration de la présentation d'antigène [166]. Ce virus a été utilisé dans plusieurs essais cliniques contre le GBM et les tumeurs solides [167, 168] et est toujours en étude pré-clinique pour le mésothéliome [169].

2.2.3 *Poliovirus*

Le poliovirus est un virus à ARN simple brin non enveloppé qui utilise le récepteur CD155 pour entrer dans les cellules (tableau III). Le virus sauvage est hautement pathogène chez l'homme et doit donc être atténué pour être utilisé comme vecteur oncolytique. Une version atténuée de ce virus, la souche Sabin, a montré un tropisme particulier pour les cellules de gliome, lié potentiellement à l'expression importante de la molécule CD155 à la surface de ces cellules [170]. Une modification de la souche atténuée de ce virus (PVS-RIPO) a montré une augmentation de la sélectivité de ce virus pour le GBM [171]. Aujourd'hui le PVS-RIPO est en essai clinique de phase I pour le GBM.

2.2.4 *Virus de la stomatite vésiculaire (VSV)*

Le VSV est un virus à ARN simple brin enveloppé (tableau III). C'est un virus oncolytique efficace du fait de sa cinétique de réplication rapide, de sa capacité à cibler spécifiquement les tumeurs et de son potentiel à induire une large gamme de réponses immunoactivatrices dans le microenvironnement tumoral. Son efficacité *in vivo* a été démontrée dans plusieurs types de cancers tels que le carcinome hépatocellulaire et l'adénocarcinome pancréatique [172, 173]. Concernant le mésothéliome, des études ont montré que l'utilisation d'un VSV codant pour le gène de l'IFN- β augmentait l'efficacité oncolytique de ce virus [174, 175]. Suite à ces résultats précliniques convaincants, des essais cliniques de phase I utilisant un VSV recombinant ont récemment débuté (NCT01628640 et NCT02923466).

2.2.5 Autres virus

Un grand nombre d'autres virus oncolytiques ont été développés. Le Virus Seneca Valley a ainsi été utilisé pour le traitement des tumeurs solides [176] et le Cocksackievirus pour le traitement du myélome, du mélanome et du cancer du sein qui tous surexpriment à leurs surfaces les récepteurs d'entrée principale de ce virus ICAM-1 et/ou DAF [157].

3. Virus de la rougeole

3.1 Les différentes souches du virus de la rougeole

Le virus de la rougeole (Measles Virus, MV) est un virus enveloppé à ARN simple brin appartenant à la famille des *Paramyxoviridae*, genre *Morbillivirus*. Il est l'agent causal de la maladie de la rougeole qui se manifeste généralement par des éruptions cutanées sous forme de petites plaques rouges accompagnées par de la fièvre et de la toux. Il est également responsable d'une immunosuppression qui est responsable de la majorité des décès causés par la rougeole [177]. Plus rarement, il peut conduire à une encéphalite fatale suite à l'infection des neurones lors de la virémie secondaire [178]. Ce virus est fortement contagieux, transmis efficacement par les aérosols entrant les voies respiratoires ou par contact direct avec des sécrétions respiratoires [179].

La première souche de MV, appelée Edmonston d'après le nom du patient concerné, a été obtenue en 1954 par Enders et Peebles [180]. L'isolation de cette souche a permis de dériver deux souches atténuées : Edmonston A et Edmonston B. Plusieurs autres souches ont été générées suite à des passages successifs sur différents types de cellules (des fibroblastes d'embryon de poulet, des cellules Vero et des cellules humaines de rein) (figure 7). L'atténuation de ces souches vaccinales est due à différentes mutations dans les protéines virales mais des études comparatives des séquences nucléotidiques montrent que la différence génomique n'est que de 0,3% entre les souches atténuées et la souche sauvage [181, 182].

En 1963, la souche atténuée Edmonston B a été la première à être utilisée aux Etats-Unis comme vaccin contre la rougeole. Ce traitement a été rapidement abandonné suite à la forte fièvre et la toux qui l'accompagnaient. La souche Schwarz, plus atténuée, est venue alors la remplacer en 1965 et est à présent le vaccin standard pour la rougeole dans la plupart des pays du monde [183]. Cette souche se caractérise par une stabilité génétique importante et par l'activation d'une réponse immunitaire à long terme [184].

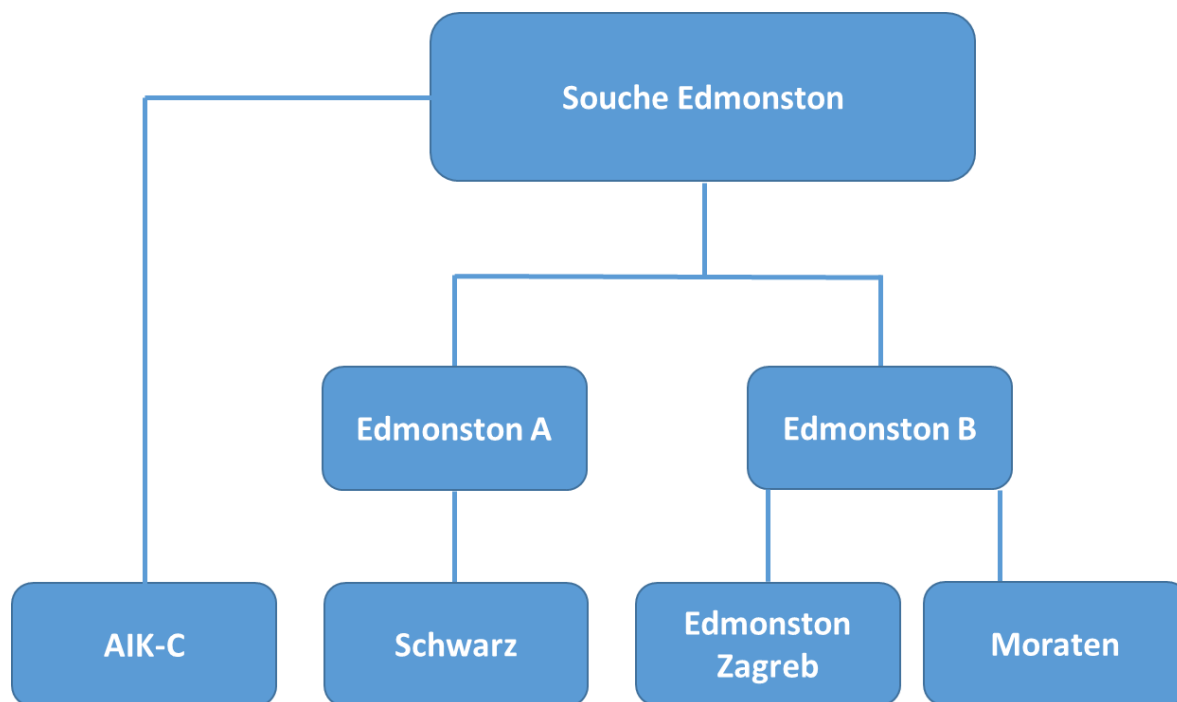


Figure 7. Souches vaccinales du virus MV

Obtention des souches vaccinales du virus de la rougeole après des passages de la souche sauvage Edmonston sur différents types cellulaires (des fibroblastes d'embryon de poulet, des cellules Vero et des cellules humaines de rein). Tiré de: Minor, P.D. Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges. *Virology*. 2015 [185].

L'âge recommandé pour la première administration du vaccin chez les enfants est entre 6 et 15 mois. Quatre-vingt cinq pourcents des enfants vaccinés à l'âge de 9 mois et 90-95% de ceux vaccinés à l'âge de 12 mois développent des anticorps protecteurs contre la rougeole [186]. Deux doses d'administration sont recommandées afin d'atteindre une immunité suffisante chez la population permettant de bloquer la transmission virale [187].

Depuis la découverte de ces souches atténuées, plusieurs milliards de personnes ont été vaccinés contre la rougeole avec un bon bilan de sécurité [188]. Les nombreuses campagnes de vaccination contre ce type de maladie ont fortement contribué à la diminution du taux de mortalité causé par le virus dans les pays développés mais aussi dans les pays en développement [189]. Cependant, la couverture vaccinale est encore insuffisante dans certains pays, notamment les pays occidentaux y compris la France, et un accroissement récent des cas de la rougeole dans ces pays est dû, en partie, à des réticences à l'égard de la vaccination [190, 191].

3.2 Structure

Le MV est un virus à ARN non segmenté de polarité négative avec un génome de 15 894 nucléotides. Il est constitué de six unités de transcription séparées par des séquences intergéniques non transcrites de trois nucléotides. Ces six gènes codent pour huit protéines : six structurales (N, P, M, F, H et L) et deux non-structurales (V et C) (figure 8.b).

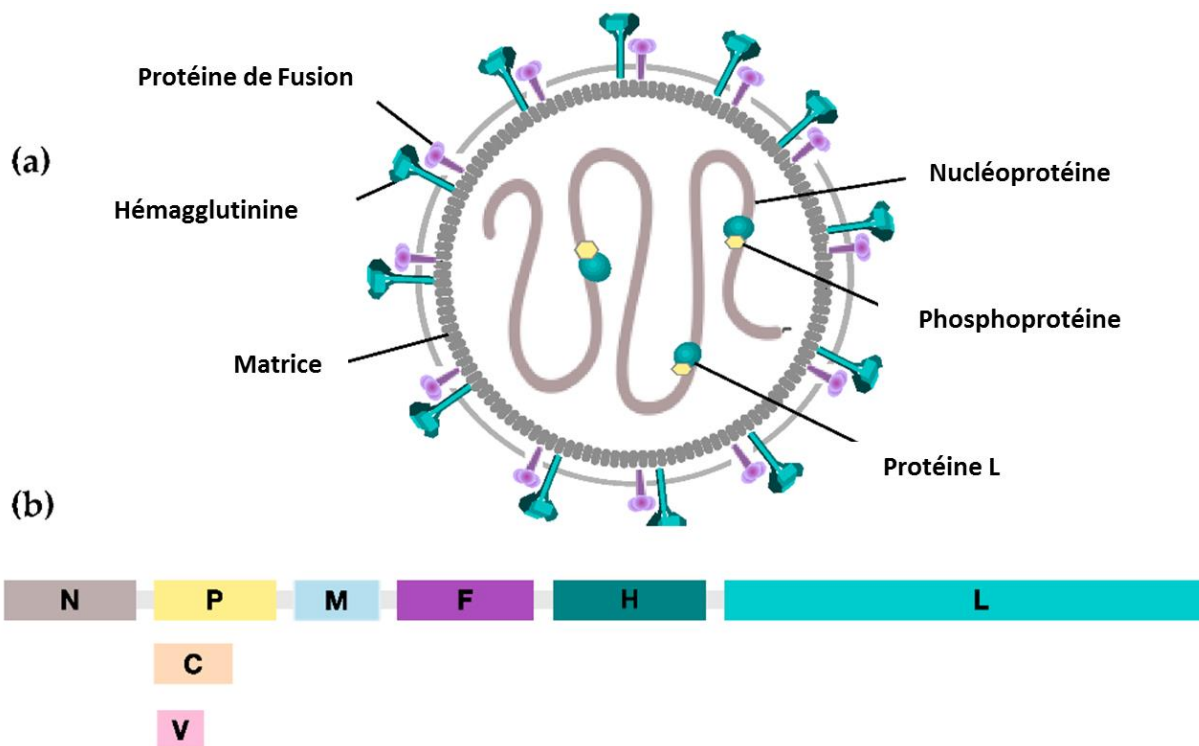


Figure 8. Structure du virus de la rougeole.

a) Représentation schématique d'une particule virale : l'enveloppe, issue de la membrane plasmique des cellules hôtes, est formée de la protéine de matrice M, de la protéine de fusion F ainsi que de l'hémagglutinine H qui permet la reconnaissance des récepteurs d'entrée sur les cellules cibles. L'ARN viral forme avec la nucléoprotéine N la ribonucléoprotéine. La phosphoprotéine P et la protéine L forment l'ARN polymérase. b) Représentation schématique de l'organisation du génome qui contient six gènes codant pour huit protéines dont deux sont non structurales (V et C). Tiré de : Aref, S. *et al.* Measles to the Rescue: A Review of Oncolytic Measles Virus. Viruses. 2016 [192].

L'enveloppe du virus, qui provient de la membrane plasmique des cellules hôtes, intègre l'hémagglutinine H et la protéine de fusion F, responsables respectivement de l'attachement du virus à un récepteur spécifique et de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique

des cellules infectées [193]. La protéine de la matrice M borde la surface interne de l'enveloppe virale et participe à la maturation du virion [194]. L'ARN du virus forme avec la nucléoprotéine N la ribonucléoprotéine qui interagit avec l'ARN polymérase ARN-dépendante formée de la protéine L (large protein) et de la phosphoprotéine P (figure 8.a).

3.2.1 *La nucléoprotéine N*

La nucléoprotéine est la protéine du MV la plus abondante. Elle est essentielle pour empaqueter le génome ARN et former une ribonucléoprotéine nécessaire à la transcription et à la réplication. Elle est formée de 525 acides aminés et de deux régions principales. La région amino-terminale (N_{core}), entre les acides aminés 1 et 400, forme le noyau de la nucléocapside hélicoïdale. La région carboxy-terminale 401-525 constitue un domaine désordonné situé à l'extérieur du noyau protéique [195]. Cette région interagit avec la protéine P et, par la présence de deux leucines à la position 523-524, avec la protéine M. De plus, ce domaine se lie, par la présence d'une asparagine à la position 522, à la protéine HSP72, favorisant la synthèse de l'ARN viral et la propagation du MV [196, 197].

3.2.2 *La phosphoprotéine P*

La phosphoprotéine P est une sous-unité de l'ARN polymérase. Elle relie la polymérase à la protéine N. Les interactions continues entre P et N assurent la progression de P sur la nucléoprotéine, ce qui permet à la polymérase de transcrire et de répliquer correctement le génome viral [198, 199]. Cette protéine interagit également avec JAK/STAT (Janus kinase 1/Signal transducer and activator of transcription) et interfère ainsi avec la voie de signalisation de l'IFN type I. Le gène de la phosphoprotéine code aussi pour les deux protéines V et C dont les fonctions sont détaillées ci-dessous.

3.2.3 *La protéine L*

Le gène de la protéine L (Large protein) code pour la sous-unité catalytique de l'ARN polymérase ARN-dépendante. Elle est cruciale pour la transcription et la réplication puisqu'elle effectue la majorité des activités enzymatiques y compris la polymérisation des nucléotides et le coiffage et la polyadénylation des ARNm [200, 201]. La protéine L contient six domaines d'acides aminés conservés assurant la fonction de la protéine et deux régions variables nommées H1 et H2 [202, 203]. Elle forme des oligomères et lie son cofacteur, la protéine P, permettant ainsi la liaison de la polymérase à la protéine N.

3.2.4 *La protéine de matrice M*

La protéine de matrice M joue un rôle primordial dans l'assemblage du virus et le bourgeonnement. Elle assure le transport des composants viraux à la membrane plasmique. Elle interagit avec les queues cytoplasmiques des protéines H et F et se lie à la nucléocapside pour la transporter vers la membrane plasmique pour l'assemblage, ce qui va réguler négativement la transcription [204, 205]. De même, la protéine M peut réguler l'activité fusio-génique de la protéine F, favorisant ainsi le bourgeonnement [206]. Enfin, cette protéine peut aussi se lier à la F-actine, ce qui empêche l'interaction de M avec les protéines H et F, privilégiant ainsi la formation de syncytia aux dépens du bourgeonnement [207].

3.2.5 *La protéine de fusion F*

La protéine de fusion F est une glycoprotéine de type I exprimée à la surface de la cellule et qui contrôle la fusion avec la cellule hôte à pH neutre. Elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur inactif de 550 acides aminés et est activée par des protéases cellulaires de type furine. Sous forme activée, elle est formée de deux sous-unités F1 (transmembranaire) et F2 (extracellulaire) liées entre elles par des ponts disulfures. La sous-unité F1 est formée d'une extrémité N-terminale, de deux domaines HR (Heptad Repeat), d'un centre riche en cystéine, d'une région transmembranaire et d'une extrémité C-terminale (figure 9) [208]. Les acides aminés 113-145, situés à l'extrémité N-terminale de F1, forment le peptide de fusion hydrophobe (FP) [181]. Ce domaine est inséré dans la membrane de la cellule hôte pendant la fusion. Une queue de 33 acides aminés, située à l'extrémité C-terminale, joue un rôle dans l'assemblage et le

bourgeonnement du virus. C'est ce domaine qui interagit avec la protéine M, régulant ainsi la fusion de la protéine F.

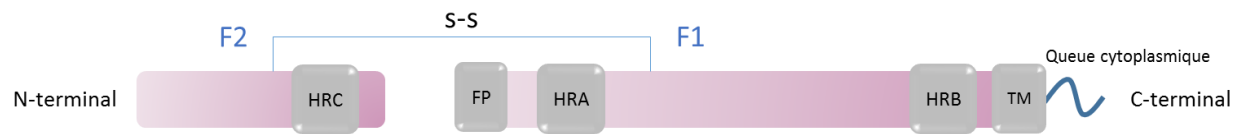


Figure 9. Structure de la protéine de fusion F

Schéma de la protéine F montrant les deux sous-unités F1 et F2 reliées par un pont disulfure ainsi que les différents domaines HR (Heptad Repeat) HRC, HRA et HRB, le peptide de fusion (FP) et le domaine transmembranaire (TM).

3.2.6 L'hémagglutinine H

L'hémagglutinine H est la deuxième protéine exprimée à la surface de la cellule infectée puis des particules. C'est une glycoprotéine de type II qui sert à l'attachement du virus à la cellule hôte grâce à son interaction avec des récepteurs spécifiques et participe au changement de conformation de la protéine F.

Formée de 617 acides aminés, cette protéine située à l'extérieur du virus comprend une partie transmembranaire et une queue cytoplasmique N-terminale formée de 34 acides aminés (figure 10). Dans la région C-terminale se trouve une tête globulaire, soutenue par une tige, responsable de la liaison avec les récepteurs [209, 210]. La protéine H interagit, par le site d'interaction qui se trouve au niveau sa tige, avec la protéine F. Une fois que l'interaction tête globulaire-récepteur a eu lieu, des changements conformationnels se transmettent à la tige qui, à son tour les transmet à la protéine F, ce qui permet le déclenchement du processus de fusion [211]. L'hémagglutinine H interagit également par sa queue cytoplasmique N-terminale avec la protéine M, ce qui affecte l'assemblage et la fusion du virus [206].

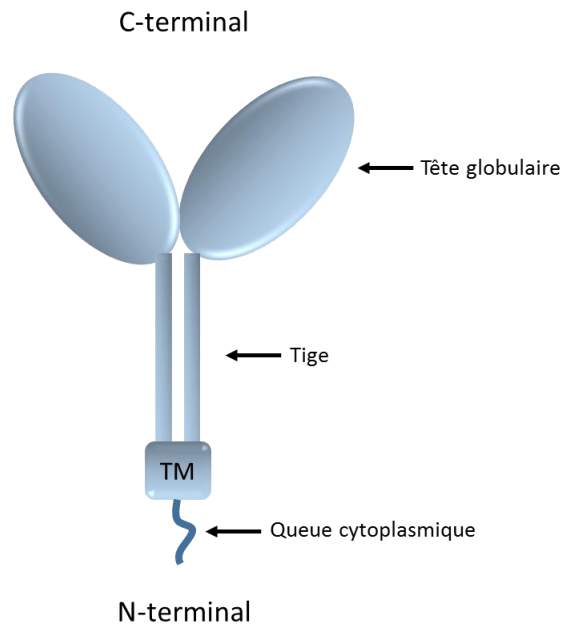


Figure 10. Structure de l'hémagglutinine H

Représentation schématique de la protéine H avec la tête globulaire, la tige (où se situe le domaine d'interaction avec la protéine F), le domaine transmembranaire (TM) et la queue cytoplasmique.

3.3 Récepteurs et tropisme

Les trois récepteurs majeurs utilisés par le virus MV sont CD150 ou SLAM (Signalling Lymphocyte Activation Molecule), CD46 et le récepteur épithélial nectine-4.

Naturellement, la souche sauvage du virus de la rougeole utilise le récepteur d'entrée SLAM principalement exprimé sur les lymphocytes B et T activés, les thymocytes immatures, les monocytes et les DCs [212, 213]. Le virus est capturé par les DCs qui se trouvent en grande quantité au niveau de l'épithélium respiratoire. Au lieu d'être dégradé, le MV est protégé et transporté dans les ganglions lymphatiques où il est transmis aux lymphocytes CD150⁺ et s'amplifie en établissant sa virémie primaire [214]. Après l'amplification du virus dans les ganglions lymphatiques, les lymphocytes et les monocytes transportent le virus vers divers organes dans tout le corps, y compris la peau, les reins, le tractus gastro-intestinal, le foie et l'ensemble des voies respiratoires [215].

Les souches atténuées du MV ont la capacité d'utiliser, en plus du CD150/SLAM, le récepteur CD46 exprimé à un niveau basal par toutes les cellules de l'organisme, à l'exception des

érythrocytes. En effet, l'isolement des souches atténuées et leurs passages sur des cellules CD150⁻ a permis de sélectionner des virus capables d'utiliser le CD46 comme récepteur d'entrée dans les cellules hôtes [216, 217]. Ce récepteur, aussi appelé MCP (Membrane Cofactor protein), est impliqué dans la régulation de l'activité du complément [218]. C'est une glycoprotéine transmembranaire de type I, de 57 à 67 kDa, appartenant à la famille des régulateurs du complément. Elle se lie, par deux domaines CCP (Complement Control Protein repeat) nommés aussi SCR (Short Consensus Repeats), aux composants C3b/C4b du complément et les inactive, protégeant ainsi les cellules humaines contre la réponse innée [219]. Le CD46 est formé d'une partie N-terminale composée de quatre CCP ou SCR, d'une région riche en sérine-thréonine-proline (STP), d'un domaine transmembranaire et d'une queue cytoplasmique (figure 11) [218, 220].

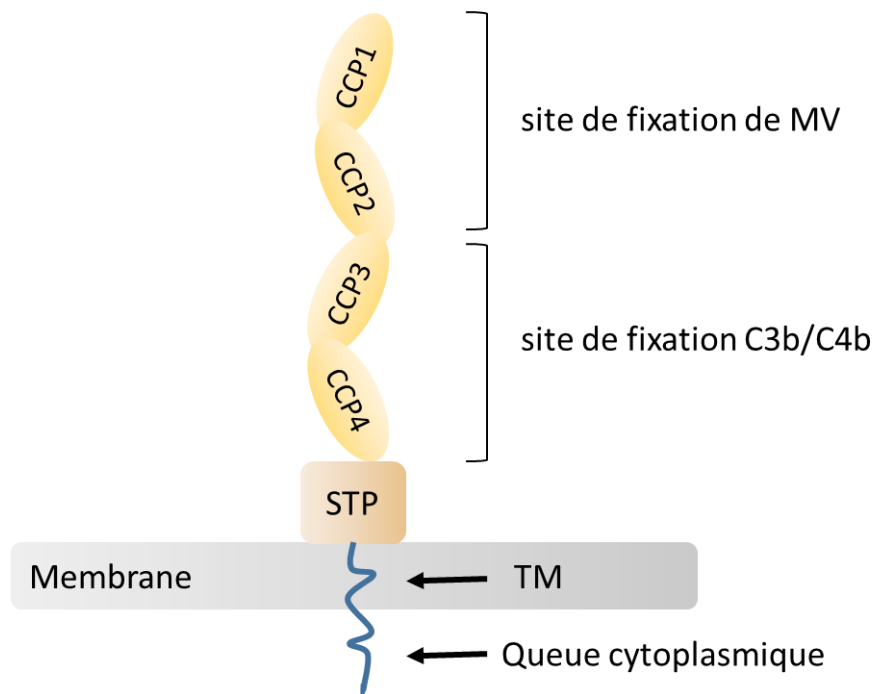


Figure 11. Structure du récepteur CD46

Schéma du récepteur CD46 illustrant ces différents composants. TM : domaine transmembranaire, CCP : Complement Control Protein repeat, STP : domaine sérine-thréonine-proline.

Le virus interagit, par sa protéine H, avec le CD46 grâce à la reconnaissance des domaines CCP1 et CCP2. Cette interaction induit une activation d'une voie de signalisation en aval via la queue

cytoplasmique induisant notamment une immuno-suppression [221]. En plus de son rôle dans l'inhibition du complément, le CD46 est aussi impliqué dans la modulation des fonctions des cellules T [222], la génération des cellules T régulatrices [223] et le contrôle de la voie de signalisation de l'IFN de type I [224].

Enfin, le récepteur nectine-4, identifié plus récemment, est exploité à la fois par la souche sauvage du MV et les souches atténuées [225, 226]. Cette protéine est exprimée, dans les jonctions adhérentes, sur la face baso-latérale des cellules épithéliales qui sont en contact étroit avec les lymphocytes T et les DCs infectés par le MV. Le virus utilise donc à ce niveau la nectine-4 pour se propager à l'épithélium des voies respiratoires humaines. Plusieurs types de cancer (côlon, poumon, sein et ovaire) surexpriment cette protéine à leur surface, permettant ainsi l'entrée de la souche atténuée dans les cellules.

3.4 Cycle réplcatif

Le cycle réplcatif du virus de la rougeole comporte plusieurs étapes. L'infection par le MV est initiée par l'interaction de sa protéine H avec le récepteur de surface présent sur la cellule hôte (figure 12, étape 1). Cette interaction induit un changement conformationnel qui active la protéine virale F, qui sert à la fusion de la membrane (figure 12, étape 2), permettant ainsi à la nucléocapside d'être libérée dans le cytoplasme de la cellule. Le génome viral est transcrit par la polymérase en ARN messagers (ARNm) qui seront traduits en protéines virales (figure 12, étapes 3 et 4). En parallèle, le génome viral est aussi transcrit en ARN viral à polarité positive (+) (ou antigénome) qui permet ensuite de produire de nouveaux génomes viraux (figure 12, étape 5). La dernière étape est l'assemblage du MV au niveau de la membrane plasmique (figure 12, étape 6). La transmission du virus se fait soit par bourgeonnement (figure 12, étape 7) soit par formation de syncytia (figure 12, étape 8).

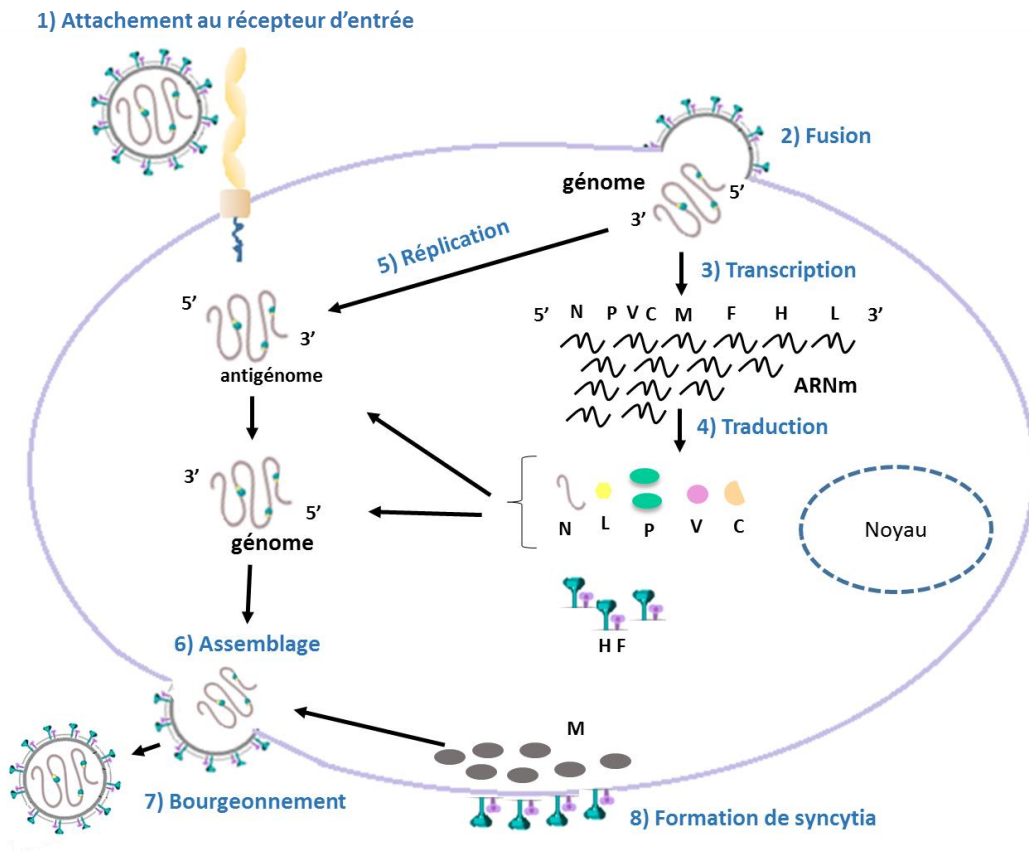


Figure 12. Cycle réplcatif du virus de la rougeole

3.4.1 L'entrée virale

L'infection d'une cellule par le MV doit, tout d'abord, commencer par une reconnaissance d'un récepteur cellulaire (SLAM, CD46 ou nectine-4) auquel le virus va se lier par l'intermédiaire de l'hémagglutinine H. Cette fixation va déclencher des changements de la conformation de la protéine F via la liaison de cette dernière à la protéine H. Ces changements de conformation de la protéine de fusion sont très importants. Tout d'abord, le peptide de fusion en N-terminale de la sous-unité F1 s'insère dans la membrane plasmique de la cellule hôte. Par la suite, la protéine F subit d'autres changements de conformation qui conduisent à l'association des domaines HRA et HRB de la sous-unité F1, ce qui permet le rapprochement des membranes de la cellule et du virus puis la fusion, libérant ainsi le génome viral dans le cytoplasme de la cellule hôte. [227]

3.4.2 La transcription et réplcation

Dans le cytoplasme, la nucléocapside libérée est utilisée comme matrice pour la transcription en ARNm et la réplication de l'ARN génomique. La transcription commence par la liaison de l'ARN polymérase ARN-dépendante, constituée des protéines L et P, à un promoteur situé à l'extrémité 3' de l'ARN génomique. La transcription du génome est séquentielle. Au niveau de chaque jonction entre les gènes se trouve une séquence tri-nucléotidique, reconnue par la polymérase, qui fournit un signal « fin de gène » produisant l'arrêt de la transcription du gène. A ce niveau, soit la polymérase se détache et recommence la transcription depuis le début, soit elle reconnaît le signal « début de gène » en aval permettant la transcription et la synthèse de l'ARNm du gène suivant. De ce phénomène « start/stop » résulte un gardien de transcription. C'est pour cela que l'ARNm de la protéine N est le plus transcrit alors que l'ARNm de la protéine L est le moins abondant [228, 229].

L'ARN génomique, libéré dans le cytoplasme, sert aussi de matrice pour la réplication et la formation de l'antigénome. En effet, la polymérase est aussi capable de transcrire le génome viral sur toute sa longueur, formant des ARN viraux à polarité positive correspondant au génome complet. Cet antigénome sert de matrice pour la production de nouveaux génomes viraux ARN (-). Ces derniers sont soit utilisés pour un nouveau cycle de transcription, soit transportés vers la membrane pour l'assemblage de nouveaux virions.

3.4.3 L'assemblage et bourgeonnement

La protéine M joue un rôle initial dans l'assemblage puisqu'elle transporte les composants viraux vers la membrane. Elle se lie directement à cette dernière et interagit simultanément avec la nucléocapside et les queues cytoplasmiques des protéines F et H. Une délétion de la protéine M abolit presque complètement la formation de virions ce qui souligne le rôle crucial de cette protéine dans l'assemblage [230].

Les particules virales se forment par bourgeonnement au niveau de la membrane cellulaire [231]. Ce bourgeonnement assure la formation de l'enveloppe virale, dérivée de la membrane plasmique, dans laquelle s'insèrent les deux protéines F et H. La surface extérieure des particules virales consiste donc en une membrane provenant de la cellule hôte riche en glycoprotéines virales.

3.4.4 La formation de syncytia

Outre le bourgeonnement, le virus de la rougeole peut se transmettre aux cellules voisines non infectées par la formation de syncytia. En effet, la cellule infectée exprime à sa surface les deux protéines F et H, ce qui va lui permettre de fusionner avec d'autres cellules exprimant les récepteurs au MV à leur surface, par un mécanisme similaire à la fusion du virus avec la cellule hôte. Il résulte de ce phénomène la formation de cellules multinucléées appelées syncytia qui permettent la propagation du virus. Le phénomène de syncytia est aussi observé dans le cas où le bourgeonnement n'est pas possible. C'est le cas quand la matrice M du virus interagit avec la F-actine, empêchant ainsi son interaction avec les protéines F et H [207].

3.5 Les protéines non-structurales du virus de la rougeole

Le virus de la rougeole code, dans son génome, pour deux protéines non-structurales appelées V et C dont les séquences sont contenues dans le gène P. Elles sont considérées comme non-structurales car elles sont absentes dans les virions lors de l'assemblage du virus. Cependant, elles sont importantes pour le cycle d'infection car elles jouent un rôle primordial dans la virulence. En effet, il a été démontré que, chez des souris transgéniques exprimant CD46, le taux de mortalité et les symptômes cliniques étaient plus faibles lors de l'utilisation de virus déficients pour les protéines V ou C en comparaison avec le virus sauvage [232].

La synthèse de la protéine V est initiée à partir du même codon de départ que P. Cependant, un décalage du cadre de lecture est créé par l'ajout d'une guanosine. Ce processus est appelé « édition de l'ARNm ». Ainsi la protéine V partage avec la protéine P un domaine N-terminal de 231 acides aminés mais diffère par son domaine C-terminal (respectivement 69 et 276 acides aminés) [233].

La protéine C, quant à elle, est formée de 168 acides aminés. Elle est traduite à partir d'un cadre de lecture propre qui débute 22 acides aminés en aval de celui des deux protéines P et V. Par conséquent, ces deux dernières ne partagent aucune homologie de séquence avec la protéine C [234].

3.5.1 Place de la protéine V dans l'infection

La protéine V joue donc un rôle important dans la virulence. En effet, un virus mutant pour la protéine V pour induire son absence ou sa surexpression peut toujours se multiplier dans les cellules, ce qui démontre que la protéine V n'est pas indispensable à la production du virus [235]. En revanche, Valsamakis *et al.* ont montré, dans un modèle de souris NOD SCID greffées avec des implants de thymus et de foie humains, qu'une infection avec un MV déficient pour V induit une réplication retardée et un faible titre viral en comparaison du virus sauvage, ce qui confirme le rôle crucial de la protéine dans la virulence et suggère son implication dans la réplication efficace du MV *in vivo* [236].

Ce rôle de la protéine V peut notamment s'expliquer par l'inhibition de la voie IFN de type I. Cette inhibition se fait par le ciblage de plusieurs molécules intervenant dans la cascade de signalisation de cette voie. La protéine V a par exemple la capacité de se lier à STAT1, empêchant ainsi sa phosphorylation et sa translocation nucléaire [237]. Elle peut aussi interagir directement, par son domaine C-terminal, avec le domaine de l'hélicase MDA-5 (melanoma differentiation associated factor 5) inhibant ainsi la production d'IFN- β [238]. En se liant à la phosphatase PP1 (Protein phosphatase 1), elle peut aussi empêcher la déphosphorylation de MDA-5 et RIG-I (Retinoic Acid Inducible Gene 1) et donc la signalisation de la voie des MAVS (Mitochondrial antiviral-signaling protein) et l'activation d'IRF-3 (Interferon Regulatory Factor 3) [239, 240].

Outre son implication dans le blocage de la voie IFN, la protéine V intervient aussi dans la régulation de la synthèse des ARNm viraux. En effet, une infection de cellules par un MV déficient en V induit une accumulation des ARNm et donc des protéines virales. Inversement, l'utilisation d'un virus surexprimant V diminue considérablement l'expression des gènes viraux [241]. Cette régulation semble être importante pour la multiplication du virus parce qu'un déséquilibre entre les protéines virales synthétisées et la réplication du génome affaiblit l'assemblage et la propagation du virus.

Enfin, la protéine V semble aussi jouer un rôle dans l'inhibition de l'inflammasome. En effet, l'infection par le MV induit l'activation de l'inflammasome NLRP3 et par la suite la production de la cytokine inflammatoire IL-1 β . Komune *et al.* ont montré que le virus MV sauvage induit une production moins importante d'IL-1 β qu'un virus déficient pour la protéine V. Cette dernière semble interagir avec le domaine C-terminal de NLRP3 bloquant ainsi la sécrétion d'IL-1 β [242].

3.5.2 Place de la protéine C dans l'infection

La protéine C joue elle aussi un rôle crucial dans la virulence. Tout comme la protéine V, elle n'est pas indispensable pour la multiplication du virus mais elle est cependant très importante pour sa réplication. En effet, une étude a montré que la délétion de la protéine C (MV- Δ C) n'induit pas de défaut dans la multiplication du virus [243]. Cependant, Takeuchi *et al.* ont montré, dans une étude *in vivo* chez le macaque, que suite à une infection par le MV- Δ C, le nombre de particules virales infectieuses dans le thymus était fortement diminué par rapport à une infection avec le virus sauvage [244].

La protéine C joue un rôle important dans l'inhibition de la voie IFN de type I en la bloquant de plusieurs manières. En effet, une étude réalisée par McAllister *et al.* a montré que l'utilisation d'un MV- Δ C induisait une production très élevée d'IFN- β en comparaison avec le virus sauvage. Cette production est corrélée avec une augmentation de l'activité d'IRF-3, de NF- κ B et d'ATF-2 (activating transcription factor 2), éléments primordiaux pour la transcription du gène de l'IFN- β [245]. Une autre étude a montré que la protéine C du MV se déplace entre le noyau et le cytoplasme et que l'activation d'IRF-3 par les kinases en amont ainsi que son importation nucléaire ne sont pas affectées en présence de C, ce qui suggère une cible nucléaire de cette protéine qui induirait l'inhibition de la transcription de l'IFN- β [246].

De plus, une inhibition de la voie PKR, dans des cellules humaines Hela, a montré une amélioration de la réplication du virus MV- Δ C alors qu'aucun changement n'a été observé dans le cas du virus sauvage. Cette amélioration était corrélée avec une augmentation de l'expression des protéines virales. A l'inverse, l'utilisation de cellules Hela avec une voie PKR active a montré une phosphorylation accrue de PKR avec MV- Δ C, contre une absence de cette phosphorylation avec MV, et une diminution de l'expression des protéines virales. Ces résultats renforcent l'idée d'une implication de la protéine C comme agent antagoniste pour la voie PKR [247].

Un autre rôle de la protéine C est de contrôler la formation d'ARN doubles brins (double-stranded Ribonucleic acid, dsRNA). En effet, lors d'une infection virale, il y a production de dsRNA qui sont des stimulateurs de la voie PKR. Pfaller *et al.* ont montré que la délétion de la protéine C était accompagnée d'une accumulation de dsRNA lors des dernières étapes de l'infection, et qu'une autophosphorylation de PKR et la formation de granules de stress étaient corrélées avec l'apparition de ces dsRNA. Cela montre qu'en l'absence de la protéine C la quantité de dsRNA (activateurs de PKR) augmente, ce qui déclenche une réponse immunitaire innée

induisant une diminution de la réplication du MV [248]. La protéine C agit en fait comme facteur de processivité pour l'ARN polymérase virale, modulant ainsi son engagement dans la transcription et la réplication du virus [249] et contrôlant de fait la formation de dsRNA.

En outre, la protéine C joue aussi un rôle important dans le maintien de l'autophagie. L'infection par MV induit des signes successifs d'autophagie dans les cellules permissives, via des voies moléculaires distinctes et non couplées [250]. Immédiatement après l'infection, MV induit ainsi une première vague d'autophagie passant par une voie impliquant son récepteur CD46 [251]. Peu après, une deuxième vague est initiée par la protéine non structurale C [250]. Une troisième vague d'autophagie, plus prolongée, a ensuite lieu grâce à la fusion des cellules et à la formation de syncytia. Bien que cette signalisation soutenue aboutisse finalement à la dégradation du contenu de la cellule, les protéines virales échappent à cette dégradation. Ce flux autophagique est donc exploité par MV pour limiter la mort des cellules infectées et ainsi augmenter la formation des particules virales [250]. Le MV- Δ C, quant à lui, est incapable d'induire la seconde vague d'autophagie. Ce mécanisme d'autophagie induit en parallèle une destruction des mitochondries par un processus appelé mitophagie. En effet, Xia *et al.* ont montré que le MV déclenche, suite à l'autophagie, une dégradation des mitochondries qui va affecter la voie MAVS, diminuant ainsi la production de la protéine de signalisation de cette voie, ce qui affaiblit la réponse immunitaire innée [252].

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

La sécurité est l'une des conditions primordiales d'utilisation d'un virus oncolytique. Les virus qui se montrent aujourd'hui prometteurs en tant qu'agents oncolytiques sont soit des souches pathogènes qui ont été atténuées, comme des souches vaccinales, soit des virus qui, bien qu'ils puissent infecter et se reproduire dans des cellules hôtes humaines, ne causent pas de maladie importante.

Le MV possède des propriétés très intéressantes faisant de lui un agent oncolytique prometteur. Contrairement à d'autres virus à ARN, tels que le virus de la grippe et le virus de l'immunodéficience humaine, les souches vaccinales du MV démontrent une stabilité génétique exceptionnelle même après des passages prolongés dans les cellules humaines [253], ce qui explique la sécurité remarquable du vaccin MV administré chez plusieurs milliards de personnes.

De plus, le MV a un tropisme naturel envers les cellules tumorales surexprimant le récepteur CD46 à leur surface.

4.1 Ciblage spécifique des cellules tumorales

4.1.1 Surexpression du récepteur CD46

Les deux souches atténuées du virus de la rougeole les plus communes, Schwarz et Edmonston, utilisent le CD46 comme principal récepteur pour l'infection des cellules humaines, contrairement aux souches pathogènes qui elles utilisent principalement le récepteur SLAMF7/CD150 [254]. Puisque le CD46 joue un rôle dans le blocage de la cascade du complément, il est souvent surexprimé sur les cellules tumorales de nombreux types de cancer afin d'échapper à la cytotoxicité médiée par le complément [255]. Cette expression à haute densité confère au MV atténué un tropisme naturel pour les cellules tumorales. En effet, au-dessus d'un certain seuil d'expression de CD46, la mort cellulaire et la formation de syncytia médiée par l'infection virale augmentent d'une façon spectaculaire [254].

4.1.2 Défauts dans la réponse IFN de type I

Outre la surexpression du récepteur CD46, la spécificité anti-tumorale des souches atténuées du virus de la rougeole peut aussi être attribuée à des défauts de la réponse IFN de type I [256]. Le virus de la rougeole peut exploiter ces défauts, fréquemment observés dans les cellules tumorales, afin de se répliquer et se propager.

Berchtold *et al.* ont montré, dans une étude faite sur des lignées de sarcome, que cinq des huit lignées analysées étaient sensibles au virus de la rougeole. Dans les lignées résistantes au MV, l'inhibition de la réplication virale était associée à une forte expression de RIG-I et IFIT-1 (interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1) et à la phosphorylation de STAT1 (Signal transducer and activator of transcription 1), trois protéines qui interviennent dans la réponse IFN de type I. En revanche, les lignées cellulaires sensibles ont montré une expression beaucoup plus faible, retardée ou totalement manquante d'IFIT-1 ainsi qu'une phosphorylation retardée de STAT1 [257]. Cela a pu être corrigé par l'administration d'IFN- β exogène, rendant les trois lignées initialement sensibles résistantes à l'infection par le MV.

Notre équipe s'est aussi intéressée au rôle que joue cette voie dans la sensibilité à l'infection par le MV et des résultats similaires à ceux de l'équipe de Lauer ont été observés. En effet, deux études, une première réalisée par Achard *et al.* sur des lignées de mésothéliome pleuraux malins humains [256] et une deuxième par Allagui *et al.* sur des lignées de mélanomes humains [258], ont montré que l'expression du récepteur CD46 à la surface des cellules tumorales était nécessaire à l'entrée du virus dans les cellules mais que la sensibilité au MV ne corrélait pas avec le niveau d'expression de cette molécule. Cette sensibilité à l'infection par le virus dépendait en fait de défauts de la voie de signalisation des IFN de type I. Nous avons pu démontrer que les lignées présentant une réponse IFN de type I fonctionnelle étaient résistantes à la réplication du virus contrairement aux lignées présentant des défauts dans cette réponse et qu'une administration d'IFN de type I exogène inhibait la réplication du virus dans la majorité des lignées sensibles.

Nos résultats, ainsi que les résultats des autres équipes, montrent que le statut de la voie de IFN de type I conditionne l'efficacité du MV oncolytique. Même si la plupart des cancers présentent des défauts dans cette voie et sont donc des cibles idéales pour les virus oncolytiques naturellement sensibles à la réponse antivirale, la réponse IFN de type I fonctionnelle dans certains cancers pourrait cependant constituer un obstacle pour la virothérapie.

4.2 Etudes précliniques

L'efficacité oncolytique du MV envers différents types de cancers humains a été démontrée dans plusieurs études précliniques *in vitro* et *in vivo*, principalement dans des modèles de xénogreffes chez des souris immunodéficientes [259]. Parmi ces cancers, nous pouvons citer le lymphome T [260, 261], le carcinome de l'ovaire [262], le myélome multiple [263] et le glioblastome multiforme [264, 265]. Notre équipe a pu également démontrer l'efficacité du MV contre le MPM mais aussi les adénocarcinomes pulmonaires et coliques et le mélanome [256, 258, 266-268]. Toutes ces études ont montré la capacité du virus MV à cibler naturellement de nombreux types de cellules tumorales et à exercer une activité oncolytique très prononcée. Toutefois, ces dernières années ont vu de nombreux travaux portant sur la modification génétique du MV pour améliorer le ciblage tumoral et son efficacité lytique.

4.3 Amélioration de l'effet oncolytique du MV

Les avancées dans la compréhension des mécanismes biologiques et génétiques des virus au cours des dernières années ont permis d'améliorer leur manipulation afin de développer des traitements plus ciblés. Plusieurs modifications génétiques de MV ont ainsi été développées dans le but d'améliorer son effet oncolytique et de le rendre plus spécifique (figure 13).

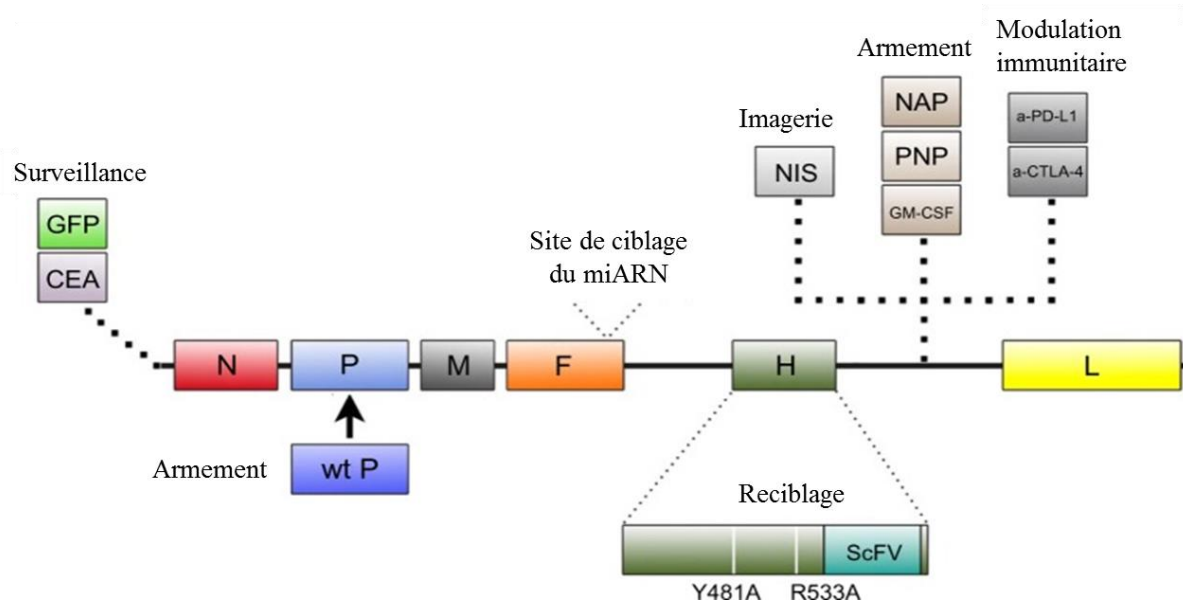


Figure 13. Modifications génétiques du MV

Parmi les modifications génétiques nous distinguons celles qui : 1) améliorent le tropisme du MV, notamment par l'insertion de ligands spécifiques de tumeurs dans la partie H ou encore l'utilisation de microARN insérés dans la partie F, 2) aident au suivi de la répllication du virus telles que les protéines GFP, CEA et NIS, 3) renforcent l'effet oncolytique par l'insertion de gènes suicides, tels que PNP, ou de transgènes immunomodulateurs, tels que NAP, GM-CSF, a-PDL1 et a-CTL-4. GFP : green fluorescent protein ; CEA : carcinoembryonic antigen ; wt P : wild-type phosphoprotein ; NIS : sodium iodide symporter ; NAP : neutrophil-activating protein ; PNP : purine nucleoside phosphorylase ; GM-CSF : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ; a-PD-L1 : anti-programmed cell death-1 ligand 1 antibody ; a-CTLA-4 : anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 antibody ; scFv : single chain fragment variable antibody. Tiré de : Hutzen *et al.* Advances in the design and development of oncolytic measles viruses. Oncolytic Virother. 2015. [269].

4.3.1 Amélioration du tropisme du MV

Bien que le virus de la rougeole ait un tropisme naturel pour les cellules cancéreuses, de nombreuses stratégies ont été développées pour augmenter la spécificité du MV afin de réduire l'infection des tissus sains et renforcer sa sécurité d'administration chez l'homme.

L'entrée cellulaire du MV est majoritairement médiée par l'interaction entre la protéine H du virus et le récepteur de surface des cellules, en général CD46. Afin de diriger le virus vers un

marqueur tumoral particulier, il est nécessaire de remplacer cette interaction naturelle par l'insertion de ligands spécifiques de tumeurs sur la partie C-terminale de H. Ainsi, des MV recombinants avec des fragments d'anticorps à chaîne unique dirigés contre les antigènes CEA (Carcinoembryonic Antigen), CD20 et CD38 ont été générés pour faciliter l'entrée ciblée dans respectivement le carcinome épithélial, le lymphome non hodgkinien et le myélome [270-272].

Une autre stratégie repose sur le changement des propriétés de fusion du MV. Comme signalé précédemment, la protéine F du virus est synthétisée sous forme d'un précurseur inactif F0. Son activation nécessite un clivage protéolytique dans les sous-unités F1 et F2 médié par la furine (protéase cellulaire). La furine reconnaît la protéine F au niveau d'un site de clivage composé de cinq acides aminés basiques (Arg-Arg-His-Lys-Arg) [273]. Une mutation au niveau de ce site de clivage, rendue dépendante de l'activation de protéases spécifiques de tumeur, a montré une limitation de l'infection du virus aux cellules cancéreuses [273-275]. Ainsi, des essais de substitutions au niveau du site de clivage avec des séquences reconnues par les MMPs (matrix metalloproteinases) confèrent une sélectivité du virus pour des cellules cancéreuses exprimant ces MMP [275].

Enfin, les microARNs (miR), qui sont des ARN simples brins non-codants jouant un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle de nos gènes, ont été eux aussi exploités pour améliorer le ciblage du virus MV [276]. En effet, ils sont exprimés dans les cellules saines et dérégulés dans plusieurs types de cancers. Il a été démontré par exemple que les miR-7 ne sont plus exprimés dans le glioblastome alors qu'ils sont omniprésents dans le tissu neuronal sain [277]. Sur cette base, un MV recombinant sensible au miR-7 a été généré afin de limiter la réplication du virus aux cellules tumorales. Ce virus a été utilisé dans un modèle de xénogreffes de glioblastome multiforme où il a démontré son efficacité avec une absence de réplication dans le tissu neuronal [278].

Toutes ces stratégies diminuent les effets indésirables du MV dans les cellules saines et augmentent en parallèle la spécificité du virus de la rougeole pour les cellules tumorales, renforçant ainsi la sécurité du MV pour une utilisation chez l'homme.

4.3.2 *Suivi de la réplication virale*

Bien que le MV ait un tropisme préférentiel pour les cellules tumorales, il est parfois nécessaire de pouvoir suivre la réplication, la localisation et la cinétique du virus *in vivo* d'une

manière non invasive afin d'optimiser en clinique les protocoles thérapeutiques et d'évaluer leur efficacité. Pour cela, des MV recombinants ont été générés. L'insertion, à l'extrémité 3' du génome en amont de la protéine N, de la protéine GFP (Green fluorescent protein) ou du CEA permet de suivre en temps réel le profil d'expression des gènes viraux. MV-GFP est très utilisé pour visualiser les fusions cellulaires induites par le virus *in vitro* et *in vivo* alors que le MV-CEA est utilisé pour le dosage sérique attestant de la réplication du virus [279].

Le MV a aussi été modifié avec le symporteur NIS (sodium iodide symporter). L'infection des cellules tumorales par le MV-NIS suivi par l'administration d'un des traceurs des isotopes d'iode tels que I^{123} et I^{124} entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire de l'isotope, permettant ainsi de visualiser, grâce aux rayonnements γ émis, la localisation et la propagation virale au sein de la tumeur par la technique d'imagerie SPECT/CT (Single-photon emission computed tomography) ou TEP.

Enfin, un MV recombinant exprimant la chaîne légère λ des immunoglobulines a été généré pour infecter les cellules du myélome multiple. L'infection des cellules par ce virus résulte en la sécrétion spécifique d'une immunoglobuline chimérique, formée d'une chaîne légère λ et d'une chaîne légère κ , détectée dans le sang [280].

4.3.3 Combinaisons thérapeutiques

La combinaison des modalités thérapeutiques a montré, dans des essais précliniques, sa capacité à produire un effet additif ou synergique dépassant l'effet que peut engendrer une approche seule. Pour cela plusieurs stratégies de combinaisons impliquant la virothérapie ont été développées et testées.

a. La radiovirothérapie

Outre l'utilisation du virus recombinant MV-NIS pour le suivi de la réplication virale, l'expression du NIS augmente l'efficacité de la virothérapie en facilitant l'entrée cellulaire des radio-isotopes tels que I^{131} et Re^{188} qui ont la capacité d'induire des dommages liés à l'irradiation dans le microenvironnement tumoral [281-283]. Une étude, réalisée par l'équipe de Russell, S.J. dans des modèles de myélome multiples *in vivo* a montré qu'une administration d'une dose

relativement faible de MV-NIS suivie de l'isotope I^{131} entraîne une éradication de cellules tumorales infectées naturellement résistantes à la lyse par le MV atténué utilisé seul [281].

b. La chimiovirothérapie

Dans l'optique de combiner la virothérapie à la chimiothérapie, des souches atténuées de MV exprimant des gènes de suicide dans leur génome ont été générées. Ces gènes catalysent des promédicaments chimiothérapeutiques en des métabolites hautement toxiques qui vont s'incorporer dans l'ADN des cellules en répllication et induire par la suite leur apoptose.

La PNP (purine nucleoside phosphorylase) d'*Escherichia coli* est une enzyme qui convertit la fludarabine et le MeP-dR (6-methylpurine-2'-deoxyriboside) en 2-fluoroadenine et MeP (6-methylpurine) hautement toxiques. L'expression de PNP par un virus modifié MV-CD20 a démontré une amélioration de l'efficacité thérapeutique dans un modèle murin de lymphome de Burkitt après administration de la fludarabine [284]. De même, l'injection intraveineuse du virus MV-CEA-PNP suivie de l'administration de MeP-dR a montré une amélioration de l'efficacité anti-tumorale du virus avec une augmentation significative des taux de survie dans un modèle syngénique de xénogreffes d'adénocarcinomes du côlon [285].

Une autre équipe a aussi généré un MV exprimant une autre enzyme bactérienne, la super-cytosine désaminase (SCD). Cette enzyme convertit le promédicament 5-fluorocytosine (5-FC) en 5-fluorouracile (5-FU) et en 5-fluorouridine-monophosphate (5-FUMP). Ce dernier joue un rôle dans la réparation de l'ADN et inhibe la synthèse des ARNs et de l'ADN [286]. L'administration combinée du MV-SCD et de 5-FC a démontré son efficacité chez la souris dans des modèles de xénogreffes de carcinome hépatique [286], de mélanome [287], de cancer de l'ovaire [288] et le cholangiocarcinome, un cancer des voies biliaires [289].

c. L'immunovirothérapie

L'une des stratégies visant à l'amélioration de l'effet oncolytique du virus de la rougeole est l'insertion de transgènes immunomodulateurs capables de stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale innée ou adaptative.

Un MV codant pour le GM-CSF, une cytokine qui joue un rôle important dans le recrutement et la maturation des cellules dendritiques, a été récemment développé pour le

traitement du cancer colorectal [290]. Dans cette étude, Grossardt *et al.* ont utilisé un modèle murin immunocompétent de cancer colorectal dans lequel a été administré le MV-GMCSF par voie intratumorale. Les résultats montrent un retard de la propagation tumorale ainsi qu'une augmentation du taux de survie en comparaison avec le groupe de souris non traitées. L'efficacité de ce traitement s'accompagne d'une infiltration des tumeurs sous-cutanées par des lymphocytes T. Plus d'un tiers des souris traitées a montré une régression totale de leurs tumeurs et un rejet de greffes tumorales ultérieures, ce qui suggère un maintien de la réponse immunitaire spécifique à long terme. De même, un MV codant pour le gène de l'IFN- β murin a montré sa capacité à déclencher une infiltration de cellules immunitaires innées et à ralentir la croissance tumorale et l'angiogenèse dans des xénogreffes de mésothéliome humain [291].

Une autre équipe a aussi généré un MV exprimant la protéine NAP (neutrophil-activating protein) pour le traitement du cancer du sein métastatique. Cette protéine, qui provient de la bactérie *Helicobacter pylori*, est un agoniste du TLR2 (toll-like receptor-2) et un inducteur puissant de la réponse inflammatoire et immunitaire de type Th1. Ce MV-NAP infecte et détruit efficacement les cellules de cancer du sein grâce à une forte propagation virale et une formation importante de syncytia. Une forte sécrétion de la protéine NAP a été observée par les cellules infectées. Cette sécrétion s'accompagne d'une induction de l'expression des cytokines TNF- α , IL-6 et IL-12/23 et d'un doublement de la médiane de survie des souris traitées [292].

Une approche plus récente consiste à générer des MV recombinants codant pour des anticorps dirigés contre des points de contrôle immunitaires tels que CTLA-4 (MV-CTL-4) et PD-L1 (MV-PD-L1). Ces molécules sont des récepteurs qui jouent un rôle important dans l'inhibition des cellules T et sont utilisées par les cellules tumorales afin d'échapper à la réponse immunitaire. L'utilisation, approuvée par la FDA, des anticorps anti-CTLA-4 et anti-PD-L1 a montré des effets anti-tumoraux extrêmement prometteurs pour une grande variété de cancers [293]. Dans un modèle syngénique de mélanome, l'administration du MV-CTL-4 ou MV-PD-L1 a montré une amélioration de l'efficacité oncolytique du virus avec une augmentation de la médiane de survie chez les souris traitées par MV-PD-L1. Cela était associé à une augmentation significative du nombre de lymphocytes T cytotoxiques et à une diminution de l'infiltration des cellules T régulatrices dans les tumeurs [294].

4.4 Etudes cliniques

Le premier essai thérapeutique sur le MV oncolytique a été réalisé par un groupe suisse en 2005. Il s'agissait d'une petite étude sur cinq patients atteints d'un lymphome T cutané de stade IIb et présentant une résistance au traitement conventionnel de ce cancer [261]. La souche Edmonston-Zagreb (MV-EZ) a été injectée dans la tumeur après traitement sous-cutané par l'IFN- α , un des patients étant traité pour deux lésions. Chaque cycle de traitement était constitué de deux doses distinctes de MV, relativement faibles, allant de 100 à 1000 TCID₅₀ (tissue culture infectious dose 50%). Au vingt-huitième jour du traitement, il a été observé la régression de cinq lésions sur six, la sixième ayant complètement disparu. Deux patients ont montré une amélioration de leurs lésions à distance de l'injection du virus malgré le traitement localisé. Seul un patient présenta une progression de la maladie. Cette étude a démontré la sécurité du traitement, avec des effets indésirables minimes, ainsi qu'un effet du virus au site d'injection et à distance.

A la Mayo Clinic (Rochester, MN, USA), des essais cliniques de phase I/II ont été menés pour le traitement du cancer de l'ovaire avec plusieurs types de MV recombinants. Ce type de cancer exprime non seulement fortement le récepteur CD46, mais aussi le récepteur Nectine-4 qui a été découvert récemment [295]. Une étude de phase I a d'abord été réalisée chez 21 patientes ayant un cancer de l'ovaire récurrent ou en progression, prétraités par chimiothérapie à base de platine + Taxol. Le virus modifié MV-CEA a été administré par voie intra-péritonéale pendant 4 semaines avec un maximum de six cycles par semaine de doses allant de 10³ à 10⁹ TCID₅₀. Aucune toxicité importante n'a été observée. Fièvre, douleurs abdominales et fatigue étaient les effets indésirables les plus communs chez ces patientes. Une stabilisation de la maladie chez 14 patientes sur 21 a été observée avec une médiane de survie globale de 12,15 mois [296].

Un deuxième essai clinique de phase I/II, réalisé par la même équipe, a été mené cette fois-ci avec le MV-NIS dans le but de suivre l'infection du virus. Dans cette étude, Galanis *et al.* ont injecté chez 16 patientes atteintes du cancer de l'ovaire des doses élevées de MV-NIS de 10⁸ à 10⁹ TCID₅₀. Une stabilisation de la maladie a été observée chez 14 patientes sur 16 avec une médiane de survie globale de 26,6 mois malgré la présence d'anticorps neutralisants, avec une survie relativement longue sans progression [297]. L'imagerie SPECT/CT a été utilisée pour visualiser le virus chez les patients et trois patientes ont montré des signes d'absorption du radiotracer ¹²³I.

Un rapport préliminaire d'un essai clinique de phase I chez des patients de myélome multiple traités par MV-NIS avec ou sans cyclophosphamide a confirmé une amélioration remarquable chez deux patientes fortement prétraitées ayant reçu, par voie intraveineuse, une dose

de 10^{11} TCID₅₀ de virus. Ces patientes étaient séronégatives pour les anticorps anti-MV. La première patiente a présenté une réponse complète au traitement, durable pendant 9 mois. La deuxième a présenté une réponse partielle qui a duré 6 semaines [298]. Ces résultats ont conduit à une expansion des essais vers une phase II ciblant principalement les patients séronégatifs pour MV (NCT02192775).

Actuellement, plusieurs essais de phase I/II pour différents types de cancers tels que le glioblastome (NCT00390299), le mésothéliome (NCT01503177), le cancer de la tête et du cou (NCT01846091) sont en cours à la Mayo Clinic. Enfin, une étude de phase I/II combinant le MV-NIS et l'anticorps anti-PDL-1 Atezolizumab a été lancée au début de cette année pour le traitement du cancer de poumon (NCT02919449).

CONCLUSION

La virothérapie anti-tumorale est une nouvelle stratégie très prometteuse pour la lutte contre le cancer. En effet, l'autorisation, par la FDA, du premier virus oncolytique, T-Vec, pour le traitement du mélanome encourage les études sur les virus oncolytiques et de nombreux essais cliniques sur divers types de virus sont à des phases très avancées.

Parmi les virus oncolytiques, la souche atténuée du virus de la rougeole est un candidat intéressant puisqu'il présente les caractéristiques du virus oncolytique idéal. Tout d'abord, le MV a été administré à des millions de personnes avec un excellent profil de sécurité lors des campagnes de vaccination contre la rougeole et il est donc facilement transférable en clinique contrairement à d'autres virus qui peuvent être pathogènes. Le MV cible et tue de préférence les cellules tumorales sans nuire aux cellules saines. Ce tropisme est dû à la surexpression des récepteurs spécifiques du MV à la surface des cellules tumorales et aux défauts de la voie IFN de type I observés dans la plupart des cancers. De plus, la capacité du MV à fusionner avec les cellules voisines et à induire la formation de cellules multinucléées, appelées syncytia, renforce son pouvoir oncolytique. L'une des autres caractéristiques majeures de ce virus est sa haute stabilité génétique *in vitro* et *in vivo*. En effet, il peut contenir des transgènes de grande taille tout en restant stable [299]. Aucune réversion vers la forme pathogène n'a été observée à ce jour [259]. Cela s'ajoute à la réplication du génome du MV dans le cytoplasme contrairement à d'autres virus tels que les adénovirus et les herpesvirus.

Plusieurs MV génétiquement modifiés ont aussi été développés, notamment dans le but d'améliorer sa traçabilité *in vivo*, son pouvoir lytique ainsi que sa spécificité envers les cellules tumorales. Le MV natif ainsi que les MV modifiés ont montré leur pouvoir oncolytique *in vitro* et *in vivo* dans plusieurs types de cancer. En plus de leur effet oncolytique, plusieurs études ont montré que les virus atténués, y compris le MV, ont aussi la capacité d'activer le système immunitaire et d'induire une réponse anti-tumorale qui peut jouer un rôle important dans la lutte contre les cellules malignes primaires et les métastases.

L'ensemble de ses caractéristiques fait du MV un virus oncolytique très prometteur. Les résultats cliniques obtenus jusqu'à aujourd'hui sont très encourageants du point de vue thérapeutique, même dans le cas des cancers multi-résistants disséminés [298].

IV. Réponse immunitaire et virothérapie anti-tumorale

L'influence de la réponse immunitaire sur l'efficacité de la virothérapie est un sujet controversé. En effet, certains résultats indiquent un rôle négatif du système immunitaire en raison de la capacité des anticorps ou de certaines cellules phagocytaires à réduire considérablement la propagation virale et ainsi altérer les effets anti-tumoraux des virus oncolytiques [300]. À l'inverse, il apparaît indéniable que le système immunitaire a la capacité d'agir d'une manière synergique avec de tels virus, car beaucoup d'études ont montré de meilleures réponses anti-tumorales suite à l'injection de virus oncolytiques dans des animaux immunocompétents [267, 268, 301].

1. Défense immunitaire contre la réplication virale

Nous pouvons distinguer plusieurs mécanismes qui peuvent gêner l'action des virus oncolytiques : l'activation de la réponse antivirale IFN de type I, l'activation de la mémoire immunitaire et les anticorps neutralisants s'il s'agit d'un virus contre lequel nous sommes immunisés, comme le MV.

1.1 La réponse IFN de type I

Lors d'une infection virale, la réponse immunitaire innée, en particulier la réponse IFN de type I, est activée suite à la détection de motifs viraux appelés PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). Cette détection se fait via des récepteurs PRRs (pattern recognition receptors) cytoplasmiques ou des récepteurs TLRs localisés principalement dans les compartiments endosomaux. En 2004, deux PRRs ont été identifiés comme intervenant dans la reconnaissance de l'ARN viral. Ces récepteurs sont RIG-I et MDA-5 [302, 303]. Ce sont des hélicases à ARN appartenant à la famille des récepteurs RLRs (RIG-I like receptor).

Après l'entrée cellulaire, l'ARN viral est libéré dans le cytoplasme et est reconnu par RIG-I, grâce au groupement triphosphate présent à l'extrémité 5' de l'ARN viral. MDA-5 reconnaît les longs ARN double brins et les structures d'ARN à haut poids moléculaire [304, 305]. Cette reconnaissance induit un changement de conformation de ces récepteurs permettant leur interaction et leur liaison à la protéine MAVS. Cet engagement de MAVS induit à son tour l'activation des kinases TBK1 (TANK-binding kinase), IKK ϵ (IkB kinase ϵ), IKK α et IKK β qui

sont responsables de l'activation à la fois des IRF3, IRF7 et de NF- κ B [306]. La phosphorylation d'IRF3 et IRF7 induit leur activation et leur translocation dans le noyau. NF- κ B, quant à lui, est activé suite à la phosphorylation et la dégradation de son inhibiteur I κ B. Cette dégradation par ubiquitination va permettre au facteur de transcription NF- κ B de rejoindre le compartiment nucléaire.

Une fois dans le noyau, IRF3, IRF7 et NF- κ B se lient à des sites de liaison spécifiques qui se trouvent sur le promoteur de l'IFN- β ainsi que sur les promoteurs d'un sous-ensemble d'ISG (Interferon-Stimulated Gene) tels que les IRF et les PRRs. Ceci permet l'expression d'IFN- α/β et de cytokines pro-inflammatoires ainsi que de certains ISG indépendants de la liaison des IFN de type I à leur récepteur [307].

Les IFN- α/β produits par la cellule infectée vont agir d'une manière autocrine, c'est-à-dire sur la cellule productrice elle-même, et paracrine, sur les cellules voisines, suite à leur fixation sur leur récepteur IFNAR (IFN α/β receptor) composé de deux sous-unités IFNAR 1 et 2. Cette fixation engendre l'activation de JAK1 et Tyk2 (Tyrosine Kinase 2), qui phosphorylent les deux protéines STAT1 et STAT2. Les STATs activés vont dimériser et interagir avec le facteur IRF9 pour former le complexe ISGF3 (ISG Factor 3). Ce complexe migre vers le noyau où il va se fixer sur les séquences ISRE (IFN-Stimulated Response Element) et activer la transcription d'un grand nombre d'ISG. Ces ISG couvrent un large spectre d'action. Ils possèdent des propriétés antivirales directes, peuvent être impliqués directement dans la signalisation de la voie afin d'amplifier la réponse antivirale, mais ils peuvent aussi générer une boucle de rétrocontrôle négative et positive de la signalisation [307] (figure 14).

La production d'IFN- α/β induit en plus l'activation de la voie PKR, elle-même activée par les dsRNA, qui a elle aussi un effet antiviral. Lorsqu'elle est activée, PKR met fin à la synthèse des protéines cellulaires en phosphorylant le facteur de traduction eIF2 α , favorisant ainsi la mort de la cellule et par la suite la clairance virale [308].

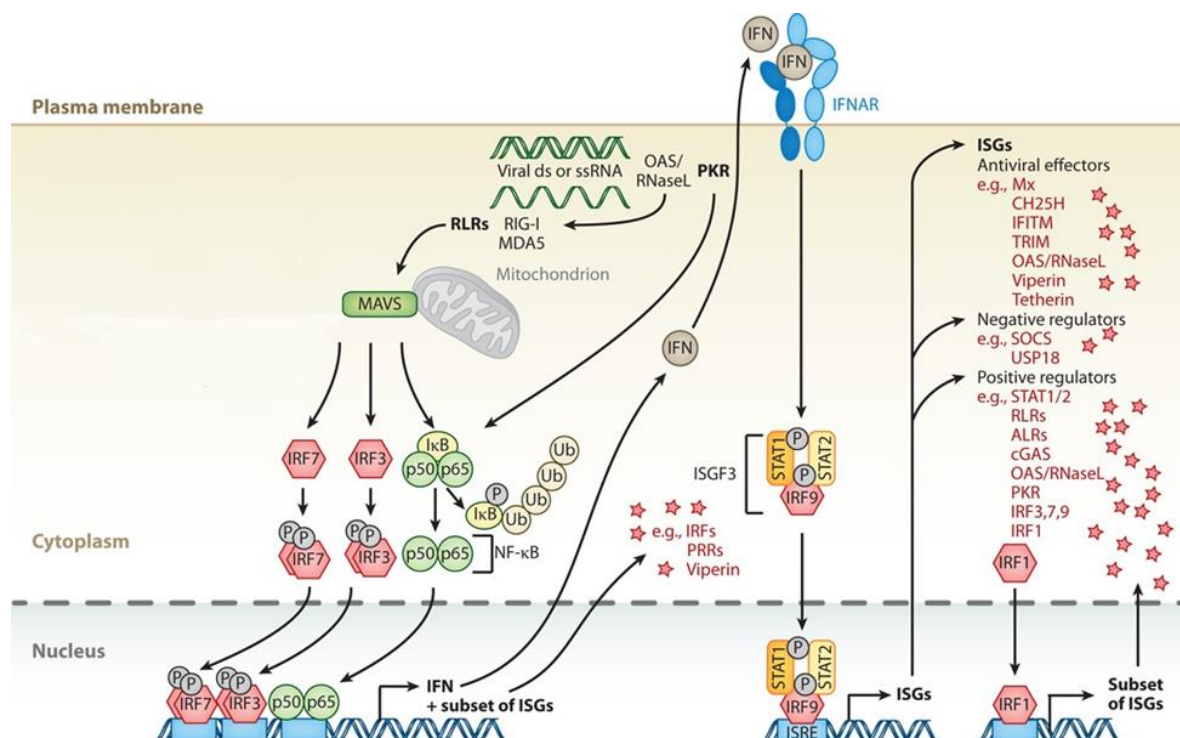


Figure 14. Induction de la voie Interféron de type I suite à l'infection par le MV

Suite à une infection, l'ARN viral du MV est reconnu par RIG-I et MDA-5 qui vont activer la voie MAVS, induisant la phosphorylation des protéines IRF3/7 et NF-κB et menant à leur translocation nucléaire. Cela va induire dans un premier temps la production d'IFNβ puis d'IFNα. Les IFN-α/β se fixent sur leur récepteur IFNAR, engendrant l'activation de la voie JAK/STAT et la production d'un nombre important d'ISG possédant des propriétés antivirales. (PPRs : pattern recognition receptors ; RIG-I : Retinoic acid-Inducible Gene-I ; MDA-5 : melanoma differentiation associated protein 5 ; MAVS : Mitochondrial Anti-Viral Signaling ; IRF : IFN Regulatory Factor ; ISGs : Interferon-Stimulated Gene ; JAK : Janus kinase 1 ; STAT : Signal transducer and activator of transcription ; ISGF3 : ISG Factor 3 ; ISRE : IFN-Stimulated Response Element). Adapté de : Schneider, W. M. *et al.* Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol.* 2014. [307].

1.2 Anticorps neutralisants

L'utilisation de virus oncolytiques contre lesquels nous sommes immunisés, tels que le MV, se heurte à l'existence d'une mémoire immunitaire efficace et à la présence d'anticorps neutralisants dans la circulation sanguine. Bien que cette limite ne semble pas avoir une incidence sur l'efficacité du MV après administration intra-cavitaire ou intra-tumorale [296, 297], elle peut avoir un impact lors de l'administration systémique du virus [309]. Pour cela, plusieurs techniques ont été développées afin de surmonter ce problème. L'une de ces stratégies consiste en l'utilisation de la cyclophosphamide, un agent alkylant immunosuppresseur utilisé aussi comme

chimiothérapie anticancéreuse [310]. Une étude, réalisée chez des souris C57BL/6 transgéniques exprimant le CD46, a montré qu'après immunisation contre le MV ou le VSV et un traitement simultané avec une dose systémique élevée de cyclophosphamide, la réponse par anticorps neutralisants était complètement supprimée avec des titres nettement inférieurs à ceux du pré-rappel [309]. Cette approche est actuellement testée dans des essais cliniques de phase II contre le myélome multiple (NCT02192775) [311].

Une autre approche consiste à cacher le virus lors de son transport vers le site où se trouvent les cellules cancéreuses. Cela a été réalisé par l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses (mesenchymal stem cells, MSCs). Les MSCs possèdent une capacité d'auto-renouvellement très élevée et des propriétés immunomodulatrices [312]. Dans un premier temps, les MSCs sont infectées *in vitro* avec le MV et administrées par la suite *in vivo* d'une manière systémique. Les cellules vont transporter le virus oncolytique jusque dans la tumeur sans que celui-ci soit neutralisé dans la circulation sanguine par les différents mécanismes immunitaires. Cette stratégie a montré son efficacité dans plusieurs modèles précliniques dont la leucémie lymphoblastique aiguë [313], le carcinome hépatocellulaire [314] et le cancer de l'ovaire [315]. D'autres transporteurs ont aussi été utilisés tels que des lymphocytes T chargés par le VSV oncolytique. Cette technique a permis de transporter le virus dans des métastases ganglionnaires en exploitant le tropisme des lymphocytes pour les organes lymphoïdes secondaires [316].

Une stratégie alternative récemment développée pour échapper au système immunitaire est de protéger le virus dans une couche de nanoparticules. En effet, les nanoparticules magnétiques peuvent former un complexe stable avec les virus, assurant ainsi leur transport vers la zone tumorale. De plus, ces particules peuvent être détectées par IRM, permettant ainsi une surveillance thérapeutique non invasive [317].

2. Système immunitaire et virothérapie : effet synergique

L'induction de la réponse immunitaire innée et adaptative semble être un élément critique pour l'éradication des tumeurs par les virus oncolytiques. Suite à une infection, le virus oncolytique induit souvent une mort immunogène des cellules tumorales, induisant la libération de DAMPs (danger-associated molecular patterns) tels que la calréticuline, la protéine HMGB1 et l'ATP (Adenosine triphosphate), ainsi que des antigènes associés aux tumeurs et des cytokines (TNF- α , IFN- γ et IL-12) [318]. La libération de ces protéines favorise la maturation des cellules

présentatrices d'antigènes (CPAs) comme les DCs [268, 319]. Ces DCs vont par la suite migrer vers les organes lymphatiques où elles vont pouvoir présenter les antigènes aux lymphocytes T et induire leur activation. Une fois activés, les LT sont capables de détruire les cellules tumorales en reconnaissant les antigènes de tumeur exprimés à la leur surface. De nombreux articles ont montré que la présence de lymphocytes infiltrant les tumeurs (Tumor Infiltrating-Lymphocytes, TIL) corrèle avec une meilleure survie des patients atteints de différents types de cancer tels que le mélanome, le cancer de l'ovaire, du rein, du sein et du côlon [320-324]. Parmi les TIL, une infiltration des lymphocytes T CD8⁺ est le plus souvent de bon pronostic [325]. Les DAMPs sont aussi capables d'activer directement les cellules NK (Natural Killer) qui vont attaquer les cellules n'exprimant pas ou peu le CMH de classe I, ce qui est relativement courant pour les cellules cancéreuses [326].

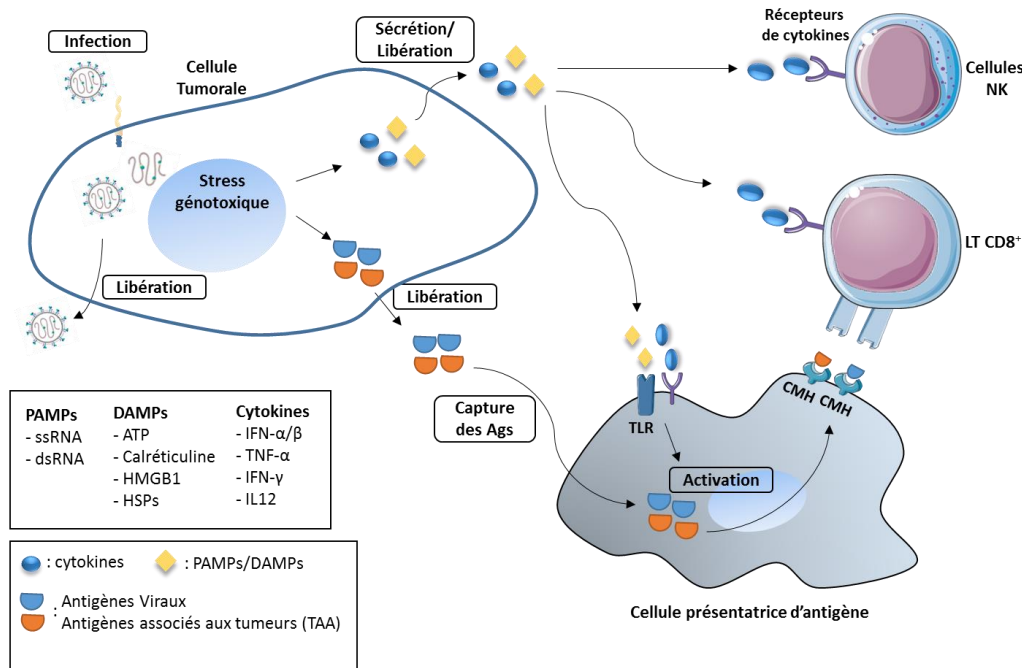


Figure 14. Induction de l'immunité anti-tumorale par le MV

Après une infection par le MV et la détection des PAMPs, les cellules cancéreuses déclenchent une réponse antivirale qui provoque un stress génotoxique et la production de cytokines ainsi que de signaux de dangers appelés DAMPs. Ces molécules sont libérées par la cellule cancéreuse infectée et stimulent les cellules immunitaires (CPAs, lymphocytes T CD8⁺, cellules NK). Les antigènes viraux et tumoraux sont internalisés par les CPAs et présentés par l'intermédiaire du CMH I aux LT CD8⁺ qui vont s'activer. Ces CPAs sont aussi capables de répondre aux motifs viraux PAMPs et aux cytokines grâce à leurs récepteurs TLR notamment. Indépendamment des CPAs, les NKs sont activés directement par la reconnaissance des cytokines libérées par les cellules. Tous ces événements induisent l'activation de la réponse immunitaire anti-tumorale.

3. Implication du MV dans la réponse immunitaire anti-tumorale

Les premiers résultats signalant une implication d'une réponse immunitaire lors d'un traitement par le MV ont été rapportés dans un modèle de xénogreffe de lymphome humain chez des souris immunodéficientes ; l'injection intra-tumorale de MV avait ainsi induit une infiltration tumorale par des neutrophiles activés [327]. L'existence d'une réponse immunitaire a été démontrée par la suite, en 2005, dans un essai clinique de phase I [261]. Dans cet essai, la souche Edmonston-Zagreb a été utilisée pour traiter cinq patients atteints de lymphome cutané. Cette étude a montré que des injections intra-tumorales de MV, après un traitement systémique par IFN- α , induisait une régression tumorale chez trois patients. Ces régressions n'étaient pas limitées au site d'injection du virus mais elles étaient observées également dans des lésions éloignées, suggérant que le traitement avait déclenché l'activation d'une réponse immunitaire anti-tumorale. Cela indique donc que l'efficacité de MV est associée à l'activation d'une réponse immunitaire efficace.

3.1 Induction de la mort cellulaire immunogène

Plusieurs laboratoires, dont le nôtre, se sont intéressés à l'identification, *in vitro*, des molécules responsables de l'activation des CPAs telles que les DCs [267, 268, 328, 329]. Tout d'abord, notre équipe a démontré que l'infection des cellules de mésothéliome par le MV induisait une mort immunogène, caractérisée par la libération de DAMPs tels que des protéines de stress (HSP70 et gp96), menant à l'activation de DCs dérivées de monocytes humains (Mo-DCs) [267]. En revanche, l'irradiation des mêmes cellules aux UV-B induisait une mort non immunogène n'activant pas les DCs.

En 2013, Donnelly et *al.* ont confirmé la capacité de MV à induire une activation des DCs dans le mélanome [328]. Dans cette étude, ils ont pu identifier différents facteurs immunogènes libérés, dont de nombreux DAMPs comme HMGB1, et un grand nombre de cytokines inflammatoires telles que les IFN de type I, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-28 et RANTES.

3.2 Induction d'une réponse LT CD8⁺ efficace

Suite à la confirmation de l'effet immunogène induit par le MV, plusieurs études se sont intéressées au statut des lymphocytes T et à leur implication éventuelle dans le renforcement de l'effet oncolytique. Parmi les études *in vitro*, Gauvrit *et al.* avaient montré que la co-culture des Mo-DCs immatures avec des cellules de mésothéliome infectées par le MV induisait leur maturation et l'internalisation de fragments provenant des cellules tumorales. Les Mo-DCs étaient ensuite capables de cross-présenter un antigène de tumeur, la mésothéline, aux lymphocytes T naïfs et d'induire par la suite l'activation spécifique des lymphocytes T CD8⁺ dirigés contre cet antigène [267].

Après avoir démontré *in vitro*, sur les cellules de mélanome infectées par le MV, que les DCs sont activées grâce à la présence des facteurs de dangers et des cytokines inflammatoires, Donnelly et ses collègues ont étudié la capacité de ces DCs à induire une réponse immunitaire adaptative. Pour cela, les DCs ont été co-cultivées avec des PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells, cellules mononucléées du sang périphérique) autologues. Les cellules de neuf donneurs sur 12 ont été capables de développer une réponse lymphocytaire spécifique CD8⁺ avec une lyse des cellules tumorales [328].

Des travaux, réalisés dans notre équipe sur les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs), ont également montré une activation des LT CD8⁺. Les pDCs représentent une population de DCs spécialisées dans la réponse antivirale et sont capables de cross-présenter les antigènes. Guillerme *et al.* ont pu démontrer que, comme pour les Mo-DCs, les pDCs sont capables de phagocyter des fragments de cellules de mélanome infectées, de maturer et de cross-présenter l'antigène tumoral NY-ESO-1 à un clone de lymphocytes T CD8⁺ spécifique de cet antigène. En revanche, dans le cas de cellules tumorales irradiées aux UV-B, aucune maturation ni présentation croisée d'antigène n'ont été observées [268].

Enfin, dans son étude clinique de phase I sur le cancer de l'ovaire traité par le MV-NIS, l'équipe d'Evanthia Galanis a aussi noté la présence de lymphocytes T spécifiques dans le sang des patientes ayant été traitées par le virus [297].

CONCLUSION

Bien que l'activation d'une réponse immunitaire puisse limiter la réplication des virus oncolytiques, y compris celle du MV, elle peut aussi être un atout pour renforcer leur effet oncolytique et l'éradication des cellules tumorales. En effet, le MV est capable d'induire une mort immunogène des cellules tumorales infectées qui est caractérisée par la libération de plusieurs DAMPS et cytokines inflammatoires. Ces facteurs de dangers sont à la base de la maturation des DCs, qu'elles soient myéloïdes ou plasmacytoïdes, qui jouent un rôle crucial dans l'immunité anti-tumorale. Ces cellules, qui sont capables d'internaliser des antigènes tumoraux, sont responsables de la présentation croisée de ces antigènes aux lymphocytes naïfs dans les organes lymphoïdes secondaires. Cette présentation induit l'activation d'une réponse lymphocytaire T CD8⁺ spécifique, de bon pronostic pour les patients, qui va exercer son activité cytotoxique envers les cellules tumorales. Ainsi, la virothérapie anti-tumorale, basée sur l'utilisation du MV et qui travaille en synergie avec la réponse immunitaire, répond à l'objectif des thérapies développées actuellement et qui consistent en l'établissement de réponses immunitaires anti-tumorales efficaces.

OBJECTIFS DE LA THESE

Le mésothéliome malin (MM) est un cancer très agressif peu étudié, étant considéré comme rare malgré une incidence en augmentation, dont le pronostic est généralement très défavorable. Les connaissances sur la biologie de ce cancer restent limitées et aucun progrès sensible n'a été obtenu pour son traitement au cours de la dernière décennie depuis l'émergence de l'association cisplatine / pemetrexed en 2003 [77, 330]. L'une des stratégies thérapeutiques les plus prometteuses pour la lutte contre ce cancer est la virothérapie anti-tumorale qui consiste à utiliser des virus oncolytiques qui ciblent spécifiquement les cellules tumorales sans nuire aux cellules saines [329]. Cette stratégie a été développée dans notre équipe en utilisant une souche atténuée du virus de la rougeole (measles virus, MV). Plusieurs de nos études *in vitro* ont ainsi montré le pouvoir oncolytique du MV contre des lignées humaines de MM. Ces propriétés sont dues, d'une part, à l'expression du récepteur CD46 à la surface de ces cellules, et d'autre part, à des défauts dans la voie IFN de type I [256]. L'activité anti-tumorale du MV repose aussi sur l'activation de la réponse immunitaire [267, 331].

Les travaux de ma thèse visent, par la mise en place de modèles animaux pertinents, 1) à améliorer la compréhension de la biologie particulière du MM, notamment l'origine de son agressivité et 2) à évaluer l'efficacité de la virothérapie anti-tumorale basée sur l'utilisation d'un virus de la rougeole modifié et d'un virus de la vaccine.

En effet, pour pouvoir combattre ce type de cancer dévastateur, il faut disposer d'outils permettant d'appréhender toute la complexité de sa biologie, notamment son caractère mésenchymateux (pluripotent), capable de se différencier en de nombreux sous-types [330]. Pour atteindre l'objectif final qui est d'analyser la réponse immune anti-tumorale associée à l'effet oncolytique du MV, il est indispensable d'étudier préalablement le microenvironnement tumoral sur des modèles expérimentaux de MM, et en particulier de caractériser les cellules immunitaires infiltrant ce type de tumeur et qui peuvent induire une immunosuppression. Ce travail est d'autant plus pertinent si nous disposons de plusieurs modèles qui diffèrent par leur degré d'invasivité, simulant ainsi en partie la diversité des situations cliniques rencontrées chez les patients. C'est le cas dans notre équipe qui a établi quatre modèles originaux de MM de rat [141] chez des animaux immunocompétents, après transplantation orthotopique de lignées néoplasiques provenant d'une biocollection établie sur des rats consanguins F344 exposés à des fibres d'amiante. Avec ces outils, l'objectif est de collecter de nombreuses données sur les interactions cellulaires et moléculaires

entre différentes composantes d'un organisme qui régissent l'évolution de la pathologie sur chaque individu.

En parallèle à ce travail et afin de confirmer *in vivo* le pouvoir oncolytique du MV précédemment établi *in vitro*, j'ai développé plusieurs modèles de mésothéliomes humains transplantés par voie péritonéale à des souris NOD SCID immunodéficientes. Le choix de ces modèles est de se rapprocher le plus possible du contexte clinique observé chez l'humain. Dans ce cadre, l'analyse du pouvoir oncolytique du MV *in vivo* prend en compte la réduction attendue de la masse tumorale mais aussi celle du potentiel métastatique. Ces modèles ont servi également à une étude comparative entre l'efficacité du MV et son variant MV-ΔC que nous espérons pouvoir tester en clinique. Ce virus de la rougeole modifié n'exprime pas la protéine C. L'absence de cette protéine induit une mort cellulaire plus rapide et donc un effet oncolytique plus marqué. Plusieurs articles démontrent que cet effet apoptotique plus prononcé est dû à des défauts d'autophagie et est associé à la formation de doubles brins d'ARN viral (dsRNA) qui induisent l'activation de la réponse immunitaire [248, 250]. Sur cette base, l'objectif de notre étude était de démontrer l'efficacité améliorée de MV-ΔC par rapport au MV non modifié *in vivo*, ainsi qu'*in vitro* en confirmant la présence de molécules impliquées dans l'activation de la réponse immunitaire.

Enfin, en plus de mes deux projets initiaux de thèse, j'ai pu participer à un nouveau projet établi par notre équipe en collaboration avec le Dr Philippe Erbs de la société Transgene (Illkirch, France). Ce projet a consisté en l'étude de la sensibilité de nos lignées de mésothéliome humain à l'activité oncolytique d'un nouveau virus, celui de la vaccine (VV). Ce virus, fourni par Transgene, est délété pour la thymidine kinase (TK) et la ribonucléotide réductase (RR). Une étude *in vitro* a tout d'abord été menée par ma collègue Tiphaine Delaunay qui a pu démontrer une sensibilité élevée chez toutes les lignées de MM suite à l'infection par le VVTK⁻RR⁻. Ces résultats très encourageants nous ont incités à tester l'efficacité du VVTK⁻RR⁻ *in vivo*. J'ai pris en charge cette partie du projet en utilisant un modèle de xénogreffe de MM humain développé lors de ma thèse.

RESULTATS

Article n° 1 : Characterization of increasing stages of invasiveness identifies stromal/cancer cell crosstalk in rat models of mesothelioma

Joëlle S. Nader, Jérôme Abadie, Sophie Deshayes, Alice Boissard, Stéphanie Blandin, Christophe Blanquart, Nicolas Boisgerault, Olivier Coqueret, Catherine Guette, Marc Grégoire, Daniel L. Pouliquen.

L'objectif principal de cet article était d'appréhender la complexité de la biologie du mésothéliome malin (MM), un cancer très agressif manquant toujours de traitement efficace. Pour cela, nous avons étudié les interactions entre le microenvironnement tumoral et les cellules malignes dans quatre modèles originaux de MM de rat qui diffèrent par leur infiltrat en cellules immunitaires et leur potentiel métastatique. Des analyses histologiques du stroma tumoral, associées à des analyses protéomiques et de l'expression de différentes cytokines, chimiokines et facteurs de croissance ont donc été réalisées dans ce but.

L'étude protéomique, basée sur l'utilisation de la technique SWATH-MS, nous a permis d'identifier des modifications quantitatives affectant un premier ensemble de protéines, communes aux trois tumeurs invasives (F4-T2, F5-T1 et M5-T1) par rapport à la tumeur non invasive (M5-T2), et d'un deuxième ensemble commun aux tumeurs F5-T1 et M5-T1, ayant un potentiel métastatique plus élevé *in vivo*, par rapport à la F4-T2. Cette dernière, avec F5-T1, était caractérisée par un infiltrat immunitaire très marqué, caractérisé par la présence de lymphocytes T CD3⁺ et de macrophages en immunohistologie, et par un niveau d'expression élevé des cytokines CCL2, CCL5, CCL7, CCL11, et TNF- α . La tumeur la plus agressive, M5-T1, quant à elle, est caractérisée par une immunosuppression soulignée avec un profil moléculaire spécifique caractérisé surtout par des changements importants dans le contenu de plusieurs protéines transmembranaires et des composants de la matrice extracellulaire. Elle se distingue par la formation d'un grand nombre de vaisseaux *in vivo* avec un taux d'expression élevé des facteurs de croissance VEGF et FGF2.

En conclusion, notre travail nous a permis d'identifier trois étapes croissantes d'invasivité, associées à des modifications de l'abondance d'un grand nombre de protéines, et à un infiltrat en cellules immunitaires décroissant. La caractérisation de ces quatre modèles de MM représente un atout pour l'évaluation de nouvelles thérapies innovantes et constitue un nouvel outil pour des recherches fondamentales en oncoimmunologie et en oncoprotéomique.

Characterization of increasing stages of invasiveness identifies stromal/cancer cell crosstalk in rat models of mesothelioma

**Joëlle S. Nader¹, Jérôme Abadie^{1,2}, Sophie Deshayes¹, Alice Boissard^{3,4}, Stéphanie Blandin⁵,
Christophe Blanquart¹, Nicolas Boisgerault¹, Olivier Coqueret^{3,4}, Catherine Guette^{3,4}, Marc
Grégoire¹, Daniel L. Pouliquen^{1*}**

¹ CRCINA, INSERM, Université de Nantes, France

² ONIRIS, Nantes, France

³ CRCINA, INSERM, Université d'Angers, France

⁴ ICO, Angers, France

⁵ Plate-forme MicroPICell, SFR François Bonamy, Université de Nantes, France.

*Correspondence: UMR 1232 Inserm (CRCINA), Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes (IRS UN), 8 quai Moncousu – BP 70721 – 44007 Nantes cedex 1, France.

Running title: Characterization of stages of invasiveness in malignant mesothelioma

ABSTRACT

Sarcomatoid mesothelioma (SM) is a devastating cancer associated with one of the poorest outcome. Therefore, representative preclinical models reproducing its main features could be crucial tools for both identification of new markers and evaluation of innovative therapies. Interactions between the tumor microenvironment and tumor cells were investigated in four original models of rat SM differing in their infiltrative and metastatic potentials. Histological analyses of tumor stroma, combined with quantitative proteomic analyses of paraffin-embedded tumor sections by SWATH-MS, and expression of cytokines and growth factors in frozen tumor samples, allowed the definition of three stages of increasing invasiveness. Invasive versus noninvasive tumors differed, with changes in 21 major proteins involved in various functions. Higher metastatic potential was associated with increased macrophage vs T-cell infiltrate and quantitative modifications of 35 additional proteins. The most invasive tumor was characterized by a pattern of specific phenotypic and molecular features affecting immunosuppression, transmembrane and cytoskeletal proteins, and components of the extracellular matrix. These four preclinical models and data represent a new resource available to the cancer research community to catalyze further investigations.

Keywords: Stroma, Invasiveness, Sarcomatoid mesothelioma, Immune cells, Rat model

Introduction

For cancers located in deep cavities, early symptoms are often atypical or absent, and thus the majority of patients are diagnosed late in the disease, leading to very low five-year survival rates. For such patients, a better understanding of the crosstalk between tumor cells and components of the tumor microenvironment (TME) (stromal cells including immune cells, blood vessels, extracellular matrix (ECM), and associated signaling molecules) [1] is critical. This is crucial for investigating the mechanisms of invasion and metastasis [2], particularly for cancers for which the mesenchymal “pluripotent” origin requires therapies that are “tailored to the microenvironment” [3]. Stromal cells are involved in growth promotion, local invasion and metastatic spread. Recent data have provided evidence that during cancer progression, an interactive relationship occurs between metastatic cancer cells and the host stroma, these dynamic interactions influencing the metastatic process [4]. These investigations suggest that understanding the dynamic and continuously evolving crosstalk between stromal and cancer cells is crucial for the development of future therapeutic approaches: targeting stromal events could improve the efficacy of current therapeutics and prevent metastatic spreading [5]. Among the sequential molecular and cellular events that allow local spread and vascular intravasation and extravasation, the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), the occurrence of oxidative stress through the synergistic role of cancer-associated fibroblasts (CAFs) and macrophages (CAMs), and the regulation of tumor angiogenesis, all play a determinant role [6]. Paracrine communication between cancer cells and CAFs appears to promote tumor invasion and also stimulates CAFs to remodel the matrix, increasing cancer dissemination [7].

Stromal cells are also involved in immune escape. The last two decades of immuno-oncology research have demonstrated that tumor development can be stopped or controlled through a process known as immunosurveillance [8]. The current clinical success of anticancer immunotherapy is encouraging but considerable uncertainties remain as to which patient groups are likely to benefit from these procedures [9], as less than half of all patients show objective antitumor responses. This raises the question of what else may be required to improve success rates [10]. In fact, an increased number of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes does not correlate with clinical efficacy [11]. Thus, antitumor effector T-cell quantity or quality may not be the key, as the TME can confer profound resistance to lymphocyte-induced cell death [10]. Recent findings in this field have demonstrated that CD8⁺ T cells recognizing tumor-specific antigens detected in patients are

dysfunctional early in the tumorigenic process [12], while the TME contributes to the exclusion of T cells from the vicinity of cancer cells, leading to their concentration outside the tumor field [13]. Regarding the role of myeloid cells in tumors, evidence indicates that the TME alters myeloid cells by converting them into potent immunosuppressive cells [14, 15]. Due the emergence of new tools, in this context the individual contributions of the different subsets of monocytes, macrophages, and DCs has started to be clarified [16]. In particular, recent findings have demonstrated that the differentiation of tumor-associated macrophages (TAMs) from monocytic precursors at tumor sites is controlled by downregulation of the activity of the STAT3 transcription factor induced by cancer cells [17]. In parallel, as increased tumor growth was previously observed in rats bearing peritoneal metastatic tumors with decreased macrophage recruitment [18], some important questions remain regarding the versatility and plasticity of cells of the monocyte–macrophage lineage [19], emphasizing the need to improve our understanding of their mechanics of activation in different microenvironments [20].

In this context, interactions between TME components and tumor cells were investigated in four models of experimental malignant mesotheliomas exhibiting marked differences in their proliferation indexes and infiltrative and metastatic potentials [21]. Phenotypic investigations of tumor stroma, combined with SWATH-MS, a new advanced and robust technique allowing the study of proteomic diversity in a quantitative manner in tissues [22], and analysis of the expression levels of cytokines and growth factors in frozen tumor samples, allowed the identification of three stages of increasing invasiveness, characterized by specific cellular and molecular features.

Results

1) Histological and immunohistochemical investigations of cancer and stromal cell interactions

Four models of rat experimental malignant mesotheliomas were investigated, named M5-T2, F4-T2, F5-T1, and M5-T1 according to the original primary cell lines from which they originated [21]. Histological and phenotypical features of the four models are depicted and described, respectively, in Table 1 and Figure 1. After intraperitoneal injection of these different cell lines, all four models were characterized by multiple nodules disseminated on the omentum and serosal surfaces of the abdominal viscera. The nodules were mostly characterized by a sarcomatoid morphology, with solid sheets and bundles of pleomorphic spindle cells. The M5-T2 tumor

differed from the three others by the absence of infiltrative potential, with tumor cell development restricted to the serosal surface, without capsular breakthrough. The cells displayed moderate cytonuclear atypias and moderate proliferative activity, with a mean Ki67 index of 6 per high-power field (HPF). The tumor stroma displayed a low blood-vessel density and a low-to-moderate level of T-lymphocyte and macrophage infiltration, either at the periphery or in the vicinity of tumor cells (Figure 2).

In contrast, the M5-T1 cell line was characterized by deep infiltration of abdominal organs and multiple visceral and regional nodal metastases. The atypias were marked-to-severe and the mean Ki67 index was high, between 11 to 17 per HPF. With this M5-T1 cell line, the tumor stroma was characterized by a high blood-vessel density and a low level of T-lymphocyte and macrophage infiltration, with immune cells mostly located at the periphery of the neoplastic nodules (Figure 2).

The F4-T2 and F5-T1 cell-lines showed an intermediate invasive phenotype, with neoplastic infiltration mostly located at the periphery of the omentum and viscera, but multifocal mild-to-moderate subcapsular invasion. Some intraparenchymal metastases were observed for the F5-T1 cell line. Both these cell lines were characterized by a high proliferative activity (from 14 to 24 Ki67-positive tumor cells by HPF). The blood vessel density was moderate. The stroma of these tumors was heavily infiltrated with macrophages, particularly in the center of the tumor nodules. There was also a significant infiltrate of T lymphocytes (mainly CD8 positive) both at the periphery and in the contact of neoplastic cells. This leukocytic infiltration of the stroma was more substantial with F4-T2 compared with F5-T1, both for T cells and macrophages (Figure 2).

2) Characterization of the first stage: acquisition of invasive properties

On average, 1300 proteins were detected and identified by SWATH-MS for each tumor, leading to three lists of proteins of interest, established from comparisons of each of the invasive tumors (1 = F4-T2, 2 = F5-T1, 3 = M5-T1) relative to the noninvasive tumor (4 = M5-T2). These lists gave Log2 fold changes in protein content, for which p values < 0.05 were recorded for both MSstats and MarkerView statistical analysis (343 proteins for 1 vs 4, 354 proteins for 2 vs 4, and 350 proteins for 3 vs 4). Between these three lists, 137 proteins were shared by the three invasive tumors (Fig. 3A and supplemental Table S1). Figures 3B, 4A and 5A indicate the main proteins of interest identified in these lists, with the correspondence between genes, protein codes and names provided in Tables S2, S3, S4, and S6. For the two most invasive F5-T1 and M5-T1 tumors (Figs.

4A, 5A and 5B) the list of proteins of interest was finalized by consideration of some additional cases taken from the 75 proteins common to the F5-T1 and M5-T1 tumors (Fig. 3A). In parallel, three complementary lists were established, corresponding to proteins for which the intensity, relative to that in the noninvasive tumor M5-T2, was found to be statistically significant only for F4-T2, F5-T1, or M5-T1. From these data, Figures 5B, 6 and supplemental Figure S1 were generated, the correspondence between genes, protein codes and names being provided in Tables S5, S6, and S7.

A number of proteins exhibited significant increases of the same order of magnitude in the three invasive tumors relative to the noninvasive tumor, M5-T2 (Fig. 3B). The most important change corresponded to galectin 3 (encoded by the *Lgals3* gene), a galactose-specific lectin associated with the cell membrane. Significantly increased fold changes also concerned prohibitin and prohibitin 2 (encoded by *Phb* and *Phb2* genes, respectively), annexin 5 (encoded by *Anxa5*) and protein S100A4 (protein S100-A6 (supplemental Table S1) also showed the same pattern, data not shown). Additional proteins showing significant increases were nucleoporin (encoded by *Nup35*), a key component of the nuclear pore complex, histone H1.5 (encoded by *Hist1h1b*), a component involved in chromatin compaction (the same pattern was also observed for histone H2A.J (supplemental Table S1), data not shown), macrophage-capping protein (encoded by *Capg*), and four proteins involved in ribosomal RNA processing: eukaryotic translation initiation factor 4H (encoded by *Eif4h*), H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4 (encoded by *Dkc1*), alanyl-tRNA editing protein Aarsd1 (encoded by *Aarsd1*), and 40S ribosomal protein S17 (encoded by *Rps17*).

Overall, four main categories of proteins were significantly decreased. The first category included a detoxifying enzyme, aldehyde dehydrogenase family member A3 (encoded by *Aldh1a3*) and membrane primary amine oxidase, involved in cancer inhibition, (encoded by *Aoc3*). A second category included the Ras-related protein R-ras, a member of the Ras subfamily of small G-proteins (encoded by *Rras*) and neural cell adhesion molecule 1, a membrane-bound glycoprotein belonging to the immunoglobulin-like CAM family of adhesion molecules (encoded by *Ncam1*). In the third category, two other membrane proteins of interest corresponded to polymerase I and transcript release factor (encoded by *Ptrf*), a key component of the structure of caveolae, also considered as a tumor suppressor, and Na (+) / H (+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1, a scaffold protein connecting plasma membrane proteins with members of the ezrin/moesin/radixin family (encoded by *Slc9a3r1*). Interestingly, ezrin and moesin (supplemental Table S1), were also

concerned with downregulation (data not shown). Finally, a fourth category contained proteins involved in the reorganization of the actin cytoskeleton. In this category, the main proteins concerned by significant decrease were keratin, type II cytoskeletal 6A (encoded by *Krt6a*), regulator of microtubule dynamics protein (encoded by *Rmdn3*), and myosin regulatory light chain 12B (encoded by *My112b*). Five other proteins belonging to the same latter family (myosins 9, 10 and 11, myosin light polypeptide 6 and unconventional myosin 1C (supplemental Table S1), were also concerned with downregulation (data not shown)).

3) Second stage: inflammation and increased invasive properties

The F5-T1 and M5-T1 tumors shared in common an increased or decreased abundance of 17 main proteins (relative to the F4-T2 tumor) (Fig. 4A). Overall, the most significant Log2FC (in the comparison of the three invasive tumors with the noninvasive tumor, M5-T2) could be summarized in two categories, according to whether Log2FC was already significant for F4-T2, or not. The first category included seven proteins: prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1 (encoded by *P4ha1*), poly(U)-binding-splicing factor PUF60 (encoded by *Puf60*), mammalian ependymin-related protein 1 (encoded by *Epdr1*), barrier-to-autointegration factor (encoded by *Banf1*), heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M (encoded by *Hnrpm*), heat shock protein beta-1 (encoded by *Hspb1*), and tubulin-specific chaperone A (encoded by *Tbca*). Three other proteins concerned with significantly decreased Log2FC were: peroxiredoxin-6 (encoded by *Prdx6*), hemoglobin subunit alpha-1/2 (encoded by *Hba1*), and ras-related protein Rab-2A (encoded by *Rab2a*).

In the second category, Log2FC were increased for three proteins: thyroid hormone receptor-associated protein 3 (encoded by *Thrap3*), sepiapterin reductase (encoded by *Spr*), and keratin, type II cytoskeletal 8 (encoded by *Krt8*). Four other proteins showed decreased Log2FC values compared with the situation in the F4-T2 tumor: amidophosphoribosyltransferase (encoded by *Ppat*), secernin-1 (encoded by *Scrn1*), eukaryotic translation initiation factor 5A-1 (encoded by *Eif5a*), and vacuolar protein sorting-associated protein 26A (encoded by *Vps26a*).

In parallel, the F5-T1 and M5-T1 tumors were characterized by common quantitative changes affecting 18 ribosomal proteins (Fig. 4B).

4) Third stage: paroxysm of invasiveness, role of the extracellular matrix

The M5-T1 tumor, which presented the highest metastatic potential of the three invasive tumors, was characterized by three important observations. First, when examining Log2FC values in the

comparison of the three invasive tumors with the noninvasive tumor, M5-T2, several proteins exhibited dramatic changes compared with the F4-T2 and F5-T1 tumors (Fig. 5A, top row). These included: apolipoprotein E (encoded by *Apoe*), fibrinogen beta chain (encoded by *Fgb*), CD44 antigen (encoded by *Cd44*), von Willebrand factor type A domain-containing protein 5A (encoded by *Vwa5a*), and 14-3-3 protein epsilon (encoded by *Ywhae*). Secondly, among the 137 proteins all sharing significant Log2FC in the three invasive tumors (compared with the noninvasive M5-T2 tumor), 11 of these exhibited maximal or minimal values specific to the M5-T1 tumor. These 11 proteins could be classified into three different categories according to whether the Log2FC values progressively increased (Fig. 5A, 2nd row) or decreased in the evolution from F4-T2 to F5-T1, and to M5-T1 (Fig. 5A, 3rd row), or whether a different evolution was observed between the three tumors (Fig. 5A, 4th row). Proteins showing an increase included: high mobility group protein HMG-1/HMG-Y (encoded by *Hmga1*), chondroitin sulfate proteoglycan 4 (encoded by *Cspg4*), dihydropyrimidinase-related protein 3 (encoded by *Dpyls3*), and fibronectin (encoded by *Fn1*). Proteins with decreased content were: fatty acid-binding protein adipocyte (encoded by *Fabp4*), adipocyte plasma membrane-associated protein (encoded by *Apmap*), heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 2 (encoded by *Hnrnp2*), and synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog (encoded by *Vat1*). Three proteins exhibited a different evolution of Log2FC in the three invasive tumors, including: interferon-induced transmembrane protein 3 (encoded by *Ifitm3*), cytosol aminopeptidase (encoded by *Lap3*), and guanine deaminase (encoded by *Gda*).

Thirdly, among the 93 proteins for which the intensities appeared specifically and very significantly higher than F4-T2, F5-T1 and the noninvasive M5-T2 tumor, two important categories were represented by cytoskeletal proteins and proteins of the ECM. The first category included: microtubule-associated protein 1B (encoded by *Map1b*), myosin-8 (encoded by *Myh8*), and exocyst complex component 7 (encoded by *Exoc7*). Proteins belonging to the second category were: chymotrypsinogen B (encoded by *Ctrb1*), anionin trypsin-1 (encoded by *Prss1*), cationic trypsin-3 (encoded by *Try3*), fibromodulin (encoded by *Fmod*), and extracellular matrix protein 1 (encoded by *Ecm1*).

5) Proteins involved in immune cell infiltrates differentiated the three invasive tumors

A careful analysis of all the proteins from the seven different lists, as illustrated in Fig. 3A, led to the identification of ten main markers that exhibited significant quantitative changes between the four tumors and appeared to be associated with immunological processes (Fig. 6). Among these,

four proteins showed a downregulation specifically observed in the most aggressive M5-T1 tumor: RT1 class I histocompatibility antigen, AA alpha chain (Günther et al. 2001), GTPase IMAP family member 4 (encoded by *Gimap4*), antigen peptide transporter 2 (encoded by *Tap2*), and high-affinity immunoglobulin epsilon receptor subunit gamma (encoded by *Fcer1g*) (Fig. 6, top and 2nd rows). Compared with the noninvasive M5-T2 tumor and the most invasive M5-T1 tumor, the intensity was very significantly increased in the F5-T1 and F4-T2 tumors for two proteins, B-1 beta chain and D-1 beta chain of the Rano class II histocompatibility antigen (encoded by *RT1Bb* and *RT1-Db1*, respectively, Fig. 6, 3rd row), an observation that was common to *Tap2* and *Fcer1g*. Three proteins appeared to be more specifically upregulated by F4-T2 or F5-T1: allograft inflammatory factor 1 (encoded by *Aif1*), leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1 (encoded by *Lrrfip1*), and C-type mannose receptor 2 (encoded by *Mrc2*). Finally, inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 1 (encoded by *Impdh1*) presented a maximum intensity for both F4-T2 and M5-T1 tumors.

In parallel to the differential intensities of proteins related to immunological processes, consideration of the lists of 92 and 72 proteins significantly upregulated or downregulated specifically in the F4-T2 or F5-T1 tumors, respectively (Fig. 3A), led to the identification of six additional proteins in each case (Fig. 8). These included four proteins of the ECM: porimin (encoded by *Tmem123*) and tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6 (encoded by *Ptpn6*), specific to F4-T2; and inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 (encoded by *Itih3*) and fibrinogen alpha chain (encoded by *Fga*), specific to F5-T1. Two other proteins localized in the endoplasmic reticulum were also concerned: polyprenol reductase (encoded by *Srd5a3*), specific to F4-T2, and REVERSED coiled-coil domain-containing protein 93 (encoded by *Ccdc93*), specific to F5-T1. Proteins specific to F5-T1 also included glutathione S-transferase Yb-3 (upregulated, encoded by *Gstm3*) and glutathione peroxidase 3 (encoded by *Gpx3*). Finally, other proteins specific to F4-T2 included the proteasomal UBX domain-containing protein 1 (encoded by *Ubxn1*) and the two multifunctional proteins, multifunctional protein ADE2 (encoded by *Paics*) and 14-3-3 protein theta (encoded by *Ywhaq*).

6) Differential expression of cytokines in invasive tumors

Analysis of the expression of a set of cytokines and growth factors by RT-qPCR led to the identification of three different profiles between the three invasive tumors. F5-T1 differed from F4-T2 and M5-T1 by the highest level of seven cytokines, suggesting a greater inflammatory

reaction. Among these cytokines, the expression of *Ccl2*, *Il1b*, *Tnf*, and *Ccl7*, which represent chemoattractants for macrophages, was significantly higher than in M5-T1 (Fig. 7, top row), whereas *Cxcl1* and *Cxcl2* levels were higher compared with F4-T2 (Fig.7, 2nd row). Furthermore, F5-T1 and F4-T2 shared in common a significantly higher expression of *Tnf*, *Ccl11*, and *Ccl5* compared with M5-T1. Besides *Cxcl10* and *Ccl5*, which are known to be lymphocyte chemoattractants, F4-T2 was also characterized by the highest expression of *Ifng* (Fig.7, 3rd row). Interestingly, M5-T1 showed the lowest expression of most cytokine genes, but was characterized by the highest expression levels of two main growth factor genes, *Vegfa* and *Fgf2* (Fig.7, bottom row).

Discussion

Acquisition of invasive properties was associated with changes in 21 main proteins

Of the proteomic data, the most significant change shared in common by the three invasive MM concerned galectin-3, a multifunctional protein distributed both intracellularly and in the tumor stroma, which is involved in the development, progression, invasion and metastasis of many cancers [23]. In addition to its function in lattice formation on the cell surface, recent lines of evidence have demonstrated the role of galectin-3 in orchestrating distinct cell events in the TME [24, 25], and thus in suppressing immune surveillance [26]. The increase in nucleoporin 53 and histone H1.5 are consistent with the previous description of the involvement of four other nuclear pore proteins [27] in cancer, and with the strong positive staining of H1.5 in different tumors types compared to the homologous normal tissue, particularly those of higher grade [28]. The increase in four multifunctional proteins, prohibitin and prohibitin 2 [29], annexin A5 [30] and protein S100A4 [31], has also been documented in cancers, contributing to tumorigenic processes such as cell proliferation, metastasis, angiogenesis and immune evasion. Regarding the detoxifying enzyme ALDH1, our data are consistent with the observation that a group of ALDH1-negative patients with non-small cell lung cancer had shorter survival compared with the ALDH1-positive group [32]. Interestingly, the STRING database [33] reveals that AOC3, an important member of the amino oxidase family of proteins, which plays a crucial role for cancer inhibition [34] and also decreased in the invasive types in our study, presents protein-protein interactions with ALDH1. In our current study, the decreased content observed in invasive tumors could also be explained by the ability of RRAS to stimulate cell adhesion, in addition to many other functions [35]. NCAM belongs to the same category of proteins involved in cell adhesion, as both upregulation and

downregulation have been reported in cancers, however inactivation of the *Ncam* gene *in vivo* has indicated a key role for this adhesion molecule in governing the interplay between tumor cells and their microenvironment [36]. At the membrane level, PTRF is also described as a key component of caveolar structure, for which downregulation correlates with advanced stages of colorectal cancers [37]. Finally, the decrease in NHRF1, a membrane protein that interacts with ezrin, platelet-derived growth factor receptor beta, and merlin [33], suggests a link with the dysregulation of intracellular pH, which has emerged as an important new hallmark of cancer [38]. Another category of proteins involved in the shaping of the cytoskeleton includes CAPG, for which the increased content is in accordance with its involvement in migration and invasiveness [39]. The decrease in ML12B and other myosins found in the three invasive tumors may be related to the fact that myosin regulatory light chains are essential for cellular integrity [40]. Regarding K2C6A, the last decade has provided evidence for active keratin involvement in cancer cell invasion and metastasis [41], loss of cytokeratin expression being associated with more-aggressive tumors [42], particularly during the EMT of cancer cells. This observation is corroborated by our previous findings on the most aggressive MM cell line, M5-T1, as immunofluorescence staining of cell monolayers revealed that only a few cells retained this epithelial differentiation marker [43]. Even more strikingly, the case of RMD3 retains much attention, as this regulator of microtubule dynamics is involved in the formation of tight functional contacts between the endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria [44], suggesting that perturbations in ER–mitochondria signaling have a profound impact on the acquisition of invasive properties.

Higher metastatic potential was associated with changes in 35 main additional proteins

In this study, several lines of evidence demonstrate that F5-T1 and M5-T1 tumors present a higher degree of invasiveness relative to F4-T2. Among the proteins concerned by the most significant positive Log2FC values shared by F5-T1 and M5-T1, two nuclear proteins appear: BAF and HNRPM. The barrier-to-autointegration factor (BAF) plays a crucial role in chromatin organization, and its frequent overexpression in cancers now represents a target for therapy [45, 46]. HNRPM is a member of the family of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, which was initially described as a regulator of splicing [47]. However, the role of a receptor that this protein plays with the carcinoembryonic antigen reveals that it is a mediator of metastasis and inflammatory response [48]. In order to protect the integrity of their genome, cells elaborate a complex network of DNA damage response characterized by many proteins. A proteomic study

has demonstrated that TR150, which is involved in CD45 alternative splicing [49], belongs to this network [50]. Thus, in addition to the four proteins involved in ribosomal RNA processing (discussed above), our data on TR150 tend to confirm that alternative splicing represents a key cellular event involved in the increased invasiveness of cancer cells [51]. In the same field, an additional line of evidence is provided by PUF60 [52]. In parallel, many ribosomal proteins were affected in the comparison of F4-T2 with F5-T1 and M5-T1, emphasizing their roles in tumorigenesis and immune signaling in addition to their essential housekeeping functions in ribosome biogenesis and protein production [53]. Finally, a growing interest has emerged recently in the dysregulation of translation initiation factors in cancer, a common feature of tumorigenesis. Our observation of a decreased abundance of IF5A1 agrees with previous findings observed in various types of cancers [54].

Regarding the detoxifying enzyme peroxiredoxin 6, its new reduction in the F5-T1 and M5-T1 tumors tends to confirm that, as this protein represents the most prominent thiol peroxidase of the cell, capturing nearly all the H₂O₂ generated [55], H₂O₂ signaling is a major second messenger associated with invasiveness [56]. In association with oxidative stress, the decreased abundance of hemoglobin subunit α -1/2 suggests that the two more invasive tumor types exhibit a much higher level of hypoxia compared with F4-T2. HSPB1 – a member of the small heat shock proteins for which overexpression in many cancer cells has been associated with an anti-apoptotic role [57] – exhibited a markedly increased content in the F5-T1 and M5-T1 tumors. However, HSPB1 is also involved in other functions, as it stabilizes the active functions of overexpressed and mutated cancer genes [58], and generates a cellular protection against oxidative stress inducers [57]. Links with cytoskeletal components have also been reported for HSPB1 [57]. Interestingly, the relative abundance of two cytoskeletal proteins increased in correlation with the invasive properties. The first, K2C8, belongs to the same family as K2C6A, mentioned above [41]. The second, TBCA, is a chaperone involved in tubulin heterodimer quaternary structure achievement [59], which function as a regulator in renal cell carcinoma progression, invasion and metastasis [60], also found up-regulated in CAFs participating to tumor progression [61].

Other proteins, including the Ras-related protein Rab-2A, secernin 1, and VP26A, are involved in the regulation of intracellular trafficking within the cell. RAB2A, like RRAS, is another member of the Ras-related GTPases that presented a decreased abundance in invasive tumors compared with M5-T2 in our study. This result means that the spatiotemporal dysregulation of vesicle traffic [62], already present in F4-T2 cells, is even more important in F5-T1 and M5-T1 cells. Secernin 1

and VP26A evolved in the same way, our results being consistent with the downregulation of secernin 1 that was previously observed in prostate cancer in comparison with normal prostatic tissue [63].

The last category includes three proteins involved in other specific functions. Sepiapterin reductase synthesizes BH₄, which is an essential cofactor for nitric oxide synthase [64], thus its increase suggests a probable impact on angiogenesis. The increase in prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1 (P4HA1) is consistent with reports demonstrating its role in increasing collagen deposition as a support of tumor growth and invasion during breast cancer development [65]. Finally, the rise in endymin content raises the interesting question of its anti-adhesive properties [66], with a probable link with the parallel augmentation in P4HA1, as their predominant targets are collagen fibrils of the ECM.

Highest invasiveness was characterized by specific immune-proteomic-cytokine profiles

Overall, our results tend to demonstrate that the most aggressive of the three invasive MM was M5-T1. This tumor cell line showed the highest invasive capacity *in vitro* [43] while deep infiltration of abdominal organs and intraparenchymal and nodal metastases were observed *in vivo*. Important significant changes in protein levels were, specifically, observed with this tumor. At the nuclear level, M5-T1 was characterized by a maximal Log₂FC increase in HMGA1, which suggests an involvement in nucleotide excision repair [67]. A second important feature was the dramatic decrease in another hnRNP protein, HNRH2, best known for its role in the regulation of alternative splicing [68]. In particular, the role of this protein in impaired splicing of important enzymes such as thymidine phosphorylase, involved in angiogenesis, was demonstrated by Stark et al., showing its implication in the acquisition of anticancer drug resistance [69]. Secondly, three proteins connected to lipid metabolism were also concerned, suggesting a probable link with dysregulated adipose endocrine function [70]. The first one, FABP4, which belongs to a family of intracellular lipid chaperones coordinating the distribution and function of lipids within cells, has been identified as a protective factor to strengthen IFN responses against tumor growth [71]. Interestingly, as for another protein of this category, APMAP, our data show that IFN- γ expression was minimal in this tumor. This emphasizes the existence of an important link with prohibitin expression and monocytic macrophages and dendritic cells, as this protein is selectively expressed in these cells [72], but also with the strong immunosuppressive properties of this tumor attested by the low number of infiltrating T-cells and macrophages, and the minimal expression of

CXCL10, CCL5, and CCL11. Finally, a striking decrease was observed in the abundance of apolipoprotein E. The elevated levels of this protein in the F4-T2 and F5-T1 tumors are consistent with the findings that serum levels have been found to correlate with prognostic evaluation in breast cancer patients [73]. However, Suzuki et al. found that the downregulation of ApoE enhanced cell invasion [74], a result that could explain some of the differences we observed between the F5-T1 and M5-T1 tumors. This differential behavior of M5-T1 compared with F4-T2 and F5-T1 was also observed for FIBB, CD44, and VWA5A, in agreement with the fact that both CD44 and VWA5A were interesting markers for detection of the early stages of colon cancer in the plasma [75]. Finally, an intriguing feature was the parallel evolution of the content in GUAD and IMDH1, and the new decrease in VAT1, which, in light of the recent work of Mendes et al., raises the question of a probable link between the deregulation of *de novo* guanine nucleotide synthesis and exosome secretion [76].

In correlation with the low numbers of CD8⁺ T-cells observed in the tumor stroma, evidence of the immunosuppressive character of the M5-T1 tumor was provided by the downregulation of two proteins, a member of the RT1 class I histocompatibility complex of the rat [77], a crucial element for the induction of CD8⁺ T-cell adaptive immune responses against tumors [78], and GIMA4, which belongs to the immunity-associated protein family involved in T-lymphocyte biology [79], two members of this family being downregulated in hepatocellular carcinoma compared with normal tissues [80]. Associated with the decrease in GIMA4 and HA12, our study demonstrated that the abundance of cytosol aminopeptidase (AMPL), a protein that influences MHC class I-mediated antigen presentation [81], was affected in M5-T1 in comparison with the F4-T2 and F5-T1 tumors. A decrease in TAP2, involved in peptide transport from the cytosol into the endoplasmic reticulum [82], was also observed specifically in the M5-T1 tumor. Finally, another dramatic decrease concerned FCERG, which regulates several aspects of the immune response [83]. All these findings lead to the suggestion that in this tumor several aspects of the dynamic process of MHC class I antigen presentation are not functional [81, 84], leading to tumor escape from immune recognition.

The M5-T1 tumor was also specifically characterized by important changes in the content of several transmembrane proteins and components of the extracellular matrix. Among proteins belonging to the first category, IFM3 was reported to be highly expressed in invasive phenotypes of different types of cancer [85-87]. CSPG4, a cell surface proteoglycan, was overexpressed in a huge range of human and animal tumors, the tumor microenvironment, and cancer initiating cells

[88]. The overexpression of DPYL3, a member of the dihydropyrimidinase-related proteins, a family of membrane-associated proteins involved in microtubule assembly, was first reported to be related to cancer three years ago [89]. In this context, the dramatic increase in fibronectin content, which was consistent with the specific maximal expression in FGF2 of this tumor, suggests that fibronectin plays an essential role as a critical mechanoregulator of the ECM [90]. Interestingly, another specificity of the M5-T1 tumor was an increased abundance of other proteins involved in the reorganization of the ECM, such as: chymotrypsinogen B and trypsins, which have been found to be elevated in tissue interstitial fluids of colorectal cancer [91]; fibromodulin, which was revealed as an important regulator of glioma cell migration [92]; and extracellular matrix protein 1, for which overexpression is related to a very poor diagnosis in various cancers [93-95]. Another set of events also occurred at the level of cytoskeletal proteins, which could explain the most invasive potential acquired by M5-T1 tumor cells. Among these proteins, MAP1B, a key actor of microtubule stability linked to the dynamic rearrangements required for malignant cells to move and metastasize [96], belongs to the microtubule-associated proteins that are autophagy-related proteins involved in ECM degradation and the epithelial-to-mesenchymal transition [97]. EXOC7 is another protein representing a link between ECM degradation, cytoskeleton, and acquisition of the highest metastatic capacity, as a member of the exocyst participating in the formation of invadopodia [98], which are key secretion sites for exosomes [99]. Yau et al. demonstrated that the gene coding for this protein belonged to a set of 14 gene candidates that were outcome predictors of distant metastatic relapses in a cohort of patients with triple-negative breast cancers [100]. Finally, another member of the family of non-muscle myosins (mentioned above), myosin-8, is an actin-dependent molecular motors, which enhanced expression is involved in the regulation of cancer cell migration and invasion [101].

Differential immune-proteomic-cytokine profiles between F5-T1 and F4-T2 tumors

In contrast to M5-T1, the F4-T2 and F5-T1 tumors shared in common higher expression levels of some cytokine genes (*Ccl2*, *Ccl5*, *Ccl7*, *Ccl11*, *Tnf*) and higher contents of TAP2, FCERG, and MHC class II antigens. These data are consistent with histological and immunohistochemical observations, showing an important infiltration of these tumors with immune cells, including CD3⁺ T-cells and macrophages. However, these two tumors differed on many points. The higher level of FCERG and the MHC class II antigens, HB2B and HB2D, in the F4-T2 tumor suggests a

more important immunoreactivity [102, 103], corroborated by a higher mean *Ifng* expression and a higher immune cells infiltration in the tumor stroma on histoslides. The higher mean expression level of *Cxcl10* relative to that of *Ccl2* or *Ccl7* in the F4-T2 tumor in comparison with F5-T1 agrees with our analyses of the number of CD8+ versus ED1+ cells infiltrated in the two tumors, and with previous reports that *Cxcl10* expression in the TME is associated with a higher level of T-cell infiltration [104]. Finally, the more substantial increase in *Ccl11* expression in F4-T2 than in F5-T1, compared with M5-T1, could also reflect a greater recruitment of leukocytes, in agreement with findings by Wågsäker et al. [105].

Conversely, the lower *Ccl5* to *Ccl7* and *Ccl5* to *Ccl2* expression ratios in F5-T1 support a TME containing less T-lymphocyte chemoattractants [106, 107] and with a greater inflammatory reaction, also attested by the maximal fibrinogen content that characterized this tumor. Two other cytokine gene expressions evolved in the same way, *Cxcl1* and *Cxcl2*, suggesting that these chemotactic factors for neutrophil recruitment are produced by TAMs and/or tumor cells in response to inflammatory stimuli [108, 109]. Among the proteins showing, specifically, a greater content in the F5-T1 tumor, the ITIH3 protein also appears to be related to the function of macrophages in inflammation, in agreement with reports from Bourguignon et al. [110] and Gomez-Toledo et al. [111].

The specific high content of AIF1 in the F4-T2 tumor versus F5-T1 may also be related to a higher immune cell infiltration [112]. Besides these features, the fact that the content of LRRFIP1 and MRC2 was substantially higher in F5-T1 compared with F4-T2 could be explained by a greater inflammatory infiltrate of F5-T1 [113, 114]. Finally, the higher intensity of IMDH1 agrees well with the greater level of T-lymphocyte infiltration of the F4-T2 tumor [115]. In addition, some proteins exhibited higher intensities that appeared to be specific to each of these two tumors. For example, the higher content of PTN6 in the F4-T2 tumor may appear to be involved in the greater level of lymphocyte infiltration, given the role of protein tyrosine phosphatases in immunoreceptor signaling [116]. The contribution of UBXN1 could be related to differences in endosomal trafficking and autophagosome maturation [117] between the two tumors. Interestingly, the higher PUR6 content in F4-T2 provides an additional element to the differential behavior of another enzyme of the same *de novo* purine biosynthesis, PUR1, thus confirming the importance of this pathway. This correlates with our histological observations of lymphocytic infiltration in this tumor, and with the known role of this enzyme in maintaining survival of activated T lymphocytes [118].

In conclusion, the specific cellular and molecular features presented by our four experimental rat MM models represent interesting new tools for basic research in oncoimmunology and oncoproteomics on the most aggressive types of cancers. The different proteins concerned by quantitative changes, which characterized each of the three invasive stages identified in our study, raise several fundamental questions of interest for future investigations on the connections between different signaling pathways within cancer cells, and on stromal/cancer cell crosstalk within the tumor tissue. Finally, these four models could also represent a good basis for the evaluation of innovative therapies, alone or combined, in particular in the field of immunotherapy.

Materials and Methods

Cell culture

The M5-T2, F4-T2, F5-T1 and M5-T1 cell lines used in this study belong to a biocollection of 27 preneoplastic and neoplastic F344 rat cell lines (http://www.inserm-transfert.fr/images/DOWNLOADS/2013_INSERTM_Research_tools_Catalogue_24072013x.pdf) established in 2011, which was characterized in a previous study [21]. All the cells were maintained 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 reagents from Gibco-Invitrogen) and cultured at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

Generation of intraperitoneal (IP) syngeneic models of MM in immunocompetent F344 Fischer rats

Fischer F344 rats were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, 69, France) and maintained under standard conditions, according to institutional and European Union guidelines for the care and use of laboratory animals in research protocols (Agreement # 01257.03, French MESR Ministry and Regional ethics committee of the Pays de la Loire, France). Rats were fed a pelleted standard diet (RM1, Special Diet Services, Witham, Essex, UK), with tap water *ad*

libitum, and were anesthetized via an isoflurane chamber (Forene®, Abbott France) and euthanized with Dolethal® (Centravet, Pluduno, Plancoët, France).

Orthotopic injections of M5-T2, F4-T2 (5×10^6 cells in 300 μ l RPMI-1640 unsupplemented medium), F5-T1 or M5-T1 cells (3×10^6 cells in 200 μ l RPMI-1640 unsupplemented medium) were performed into the peritoneal cavity of 12 week-old male Fisher rats. M5-T1- and F5-T1-treated rats bearing tumors were euthanized 2.5 and 3.5 weeks post MM cell injection, respectively. F4-T2- and M5-T2-treated rats bearing tumors were euthanized 4 and 5 weeks post MM cell injection, respectively. Following euthanasia, all tissues with small metastatic nodules or residual tumor tissue were collected and either fixed in 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA) or frozen at -80°C for further analysis.

Histology and immunohistochemistry

For histological examination, the paraformaldehyde fixed, paraffin-embedded sections of rat tumor samples and surrounding invaded tissues, when present, were cut with a Bond Max automaton (Menarini, Rungis, France) and stained with hematoxylin-phloxine-saffron (HPS). Antibodies used for immunohistochemical analyses were: anti-human Ki67 (rabbit monoclonal SP6 clone 1/100, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA) and anti-human von Willebrand Factor (rabbit polyclonal 1/400, Agilent Technologies, Les Ulis, France) with the IView Universal DAB detection kit (Roche Diagnostics) for revelation; and anti-rat ED1 antibody (MAB1435 1/100, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) used as a pan-macrophage marker, mouse anti-CD3 (SM253P, Acris Antibodies, San Diego, USA), anti-CD8 (LS-B3665, LSBio France, 92000 Nanterre), with an anti-mouse secondary antibody and N-Histofine Simple Stain Mouse MAX Peroxidase (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) as the detection reagent. Histopathology slides were scanned with a Nanozoomer 2.0 HT (Hamamatsu Photonics K. K., Japan) and photographs of slides were taken using an Eclipse 50i microscope and a Nikon DS Fi-1 digital camera (Nikon Instruments Europe B.V.) Semiquantitative evaluation and scoring of the immunohistochemical staining were performed blindly by a pathologist. Ki-67, CD3, CD8 and ED1 were assessed based on the number of positive cells counted on 10 High Power Field (HPF) by manual image analysis involving the use of the image J software, Research Service Branch, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA). Negative controls for IHC were included in each run, and consisted in replacing the primary antibody with normal mouse or rabbit serum (prediluted reagents, Roche Diagnostics).

SWATH-MS Analysis

Creation of the spectral library

To create a spectral library, we used three types of samples from rat cell lines, frozen normal tissues and formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections of the four tumor models (Roulois et al., 2016), and we performed DDA experiments. Each sample (5 μ g) was separated into a nano 2D-LC 425 system (Eksigent) using a chromxp C18CL column (3 μ m, 120 Å, 15 x 0.3 cm, Sciex) at a flow rate of 5 μ L/min. Water and ACN, both containing 0.1% formic acid, were used as solvents A and B, respectively. The following gradient of solvent B was used: 0 to 5 min 5% B, 5 to 75 min 5% to 35% B, then 10 min at 95% B, and finally 10 min at 5% B for column equilibration. As the peptides eluted, they were directly injected into a hybrid quadrupole-TOF mass spectrometer Triple TOF 5600 + (Sciex, Redwood City, CA, USA) operated with a ‘top 30’ data-dependent acquisition system using positive ion mode. The acquisition mode consisted of a 250 ms survey MS scan from 400 to 1250 m/z, followed by an MS/MS scan from 230 to 1500 m/z (75 ms acquisition time, 350 mDa mass tolerance, rolling collision energy) of the top 30 precursor ions from the survey scan.

Peptide identification and library generation were performed with Protein Pilot software (v4.5, Sciex®) using the following parameters: (1) search against a database composed by *Rattus Norvegicus* from SwissProt (release at February 2016, with 20254 entries), and iRT peptide sequences, and using (2) MMTS as fixed modification; (3) trypsin digestion (with a miss cleavage factor of 0.75, Paragon™ Algorithm). An independent False Discovery Rate (FDR) analysis using the target-decoy approach provided by Protein Pilot™ was used to assess the quality of identifications. Positive identifications were considered when identified proteins and peptides reached a 5% local FDR. A specific library of precursor masses and fragment ions was created by combining all files from the DDA experiments

Relative quantification by SWATH acquisition

Each sample (5 mg) was analyzed using the LC–MS equipment and LC gradient described above for building the spectral library, but using a SWATH-MS acquisition method. The method consisted of repeating the whole gradient cycle, which consisted of the acquisition of 32 TOF MS/MS scans of overlapping sequential precursor isolation windows (25 m/z isolation width,

1 m/z overlap, high sensitivity mode) covering the 400 to 1200 m/z mass range, with a previous MS scan for each cycle. The accumulation time was 50 ms for the MS scan (from 400 to 1200 m/z) and 100 ms for the product ion scan (230 to 1500 m/z), thus making a 3.5 s total cycle time.

SWATH MS Data Extraction and Statistical Analysis

Peak extraction of the SWATH data was performed using either the Spectronaut software (ver 8.0, Biognosys, Switzerland) or SWATH micro App embedded in PeakView (ver2.0, Sciex). SWATH data were processed with default settings in Spectronaut. Reference peptides from the iRT-kit (Biognosys) spiked into each sample were used to calibrate the retention time of extracted peptide peaks using Spectronaut. Peptide identification results were filtered with a q-value of < 1%, and excluding shared peptides. RT calibration was also performed based on iRT peptide elution profiles in PeakView using the SWATH App module (v2.0). After peak extraction with either Spectronaut or PeakView, the sum of MS2 ion peak areas of SWATH quantified peptides for individual proteins were exported to calculate the protein peak areas. For statistical analysis of the SWATH data set, peak extraction output data matrix from PeakView was imported into MarkerView (v2, Sciex) and MSstats (R package, Bioconductor) for data normalization and relative protein quantification. Proteins with a fold change > 1.5 and statistical p-value < 0.05 estimated by MarkerView and MSstats were regarded differentially expressed under different conditions.

Total RNA isolation and real-time PCR

Tumor tissues were disrupted using an MP FastPrep-24 Instrument (MP Biomedicals Inc.). Total RNA was extracted using the NucleoSpin RNA II Kit according to the manufacturer's instructions (Macherey-Nagel, Hoerd, France). The total RNAs were next treated with an rDNase solution to remove contaminating genomic DNA, and subsequently purified. Total RNA (0.5 µg) was reverse transcribed using MMLV reverse transcriptase (Invitrogen). PCR reactions were conducted using QuantiTect primer assays (Qiagen) and Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Gene expression was analyzed in non-infected and infected cells using QuantiTect primers pairs for *Ccl2*, *Il1b*, *Tnf*, *Cxcl2*, *Cxcl1*, *Ccl7*, *Ifng*, *Cxcl10*, *Ccl11*, *Ccl5*, *Vegfa*, and *Fgf2*. The gene expression was expressed as relative expression compared to the expression of the housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6.00 software (GraphPad Software Inc.). For statistical analysis comparing more than two groups, nonparametric one-way ANOVA (Kruskal-Wallis test) was used, with Dunn's post test. All data are presented as mean $\pm$ SEM. P values less than 0.05 were considered to be statistically significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Authors' Contributions

Conception and design: DP

Development of methodology: CG, DP, JA

Acquisition of data: JN, DP, AB, SD, SB

Analysis and interpretation of data: JN, DP, JA, CG

Writing, review, and/or revision of the manuscript: DP, JA, CG, JN

Administrative, technical, or material support: MG, NB, OC, CB

Study supervision: DP

Acknowledgements

The research leading to these results has received funding from the National Health and Medical Research Institute (Inserm), the “Ligue contre le Cancer” (Ligue Nationale and the Ligue inter-régionale du Grand Ouest, Comités 44 and 16), the “Fondation pour la Recherche Médicale” (FRM), the “Région Pays de la Loire”, and the ARSMESO44 association.

FIGURE LEGENDS

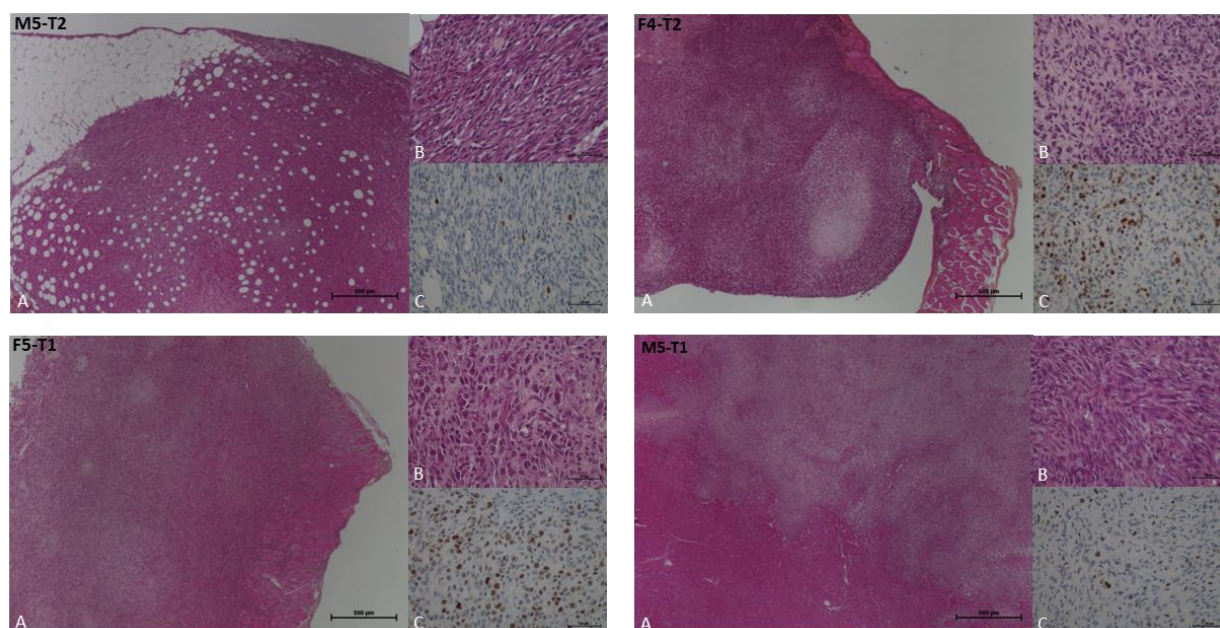


Figure 1. Distinctive features of cancer cell phenotypes of the four models of experimental malignant mesotheliomas.

A and B: Hematoxylin-phloxine-saffron (HPS) staining (respectively low and high magnification); C: Immunohistochemical detection of the Ki67 antigen (proliferation index). The four models displayed distinctive characteristics: the M5-T2 tumors are located strictly on the omental serosal surface and composed of neoplastic cells with moderate atypias and low proliferative activity; the F4-T2 and F5-T1 neoplasms are characterized by increased infiltrative potential with invasion of the deep muscular layers (diaphragm and abdominal wall) and are composed of cells with marked atypias and very high ki67 index of proliferation; the M5-T1 tumors are associated with deep infiltration of abdominal organs (liver on the picture), marked atypias and moderate to high proliferation.

Histological type*	Infiltration	Atypia	Mean Ki67 index per 10 HPF	Blood vessel density	CD3+ T-cell count (tumor periphery) per HPF	CD3+ T-cell count (tumor center) per HPF	CD8+ T-cell count (tumor periphery) per HPF	CD8+ T-cell count (tumor center) per HPF	ED1+ macrophages (tumor periphery) per HPF	ED1+ macrophages (tumor center) per HPF
M5-T2	-	+/-	56	+/-	36	96	48	82	20	36
	-	+/-	61	+/-	28	82	18	48	10	32
			58.5		32.0	89.0	33.0	65.0	15.0	34.0
F4-T2	+/-	+	248	+	88	62	64	56	64	22
	+/-	+/-	164	+	92	132	88	62	32	110
	+/-	+	148	+	98	56	110	64	48	88
F5-T1			186.7		92.7	83.3	87.3	60.7	48.0	73.3
	+	+	180	+/-	46	88	46	52	52	96
	+	++	220	+	32	44	12	56	28	82
M5-T1	+	+	186	+	28	56	14	36	62	52
	++	+	228	+	36	46	28	30	30	18
			203.5		35.5	58.5	25.0	43.5	43.0	62.0
M5-T1	++	++	125	+	42	58	34	38	20	54
	+	++	110	+	54	32	28	14	32	40
	++	+	158	++	42	10	36	12	18	44
M5-T1	++	+	172	++	82	30	24	20	16	10
	+	++	146	+	62	18	40	16	24	22
	++	++	142	+	36	12	36	18	48	24
M5-T1	++	+	160	++	96	16	58	18	18	16
	++	+	130	++	16	20	62	22	26	32
	++	+	108	++	86	22	48	14	22	10
Mean			139.0		57.3	24.2	40.6	19.1	24.0	26.5

Table 1: Histological and immunohistochemical features of cancer and stromal cell interactions. * For invasive tumors, the different situations analyzed corresponded to multiple metastatic localizations.

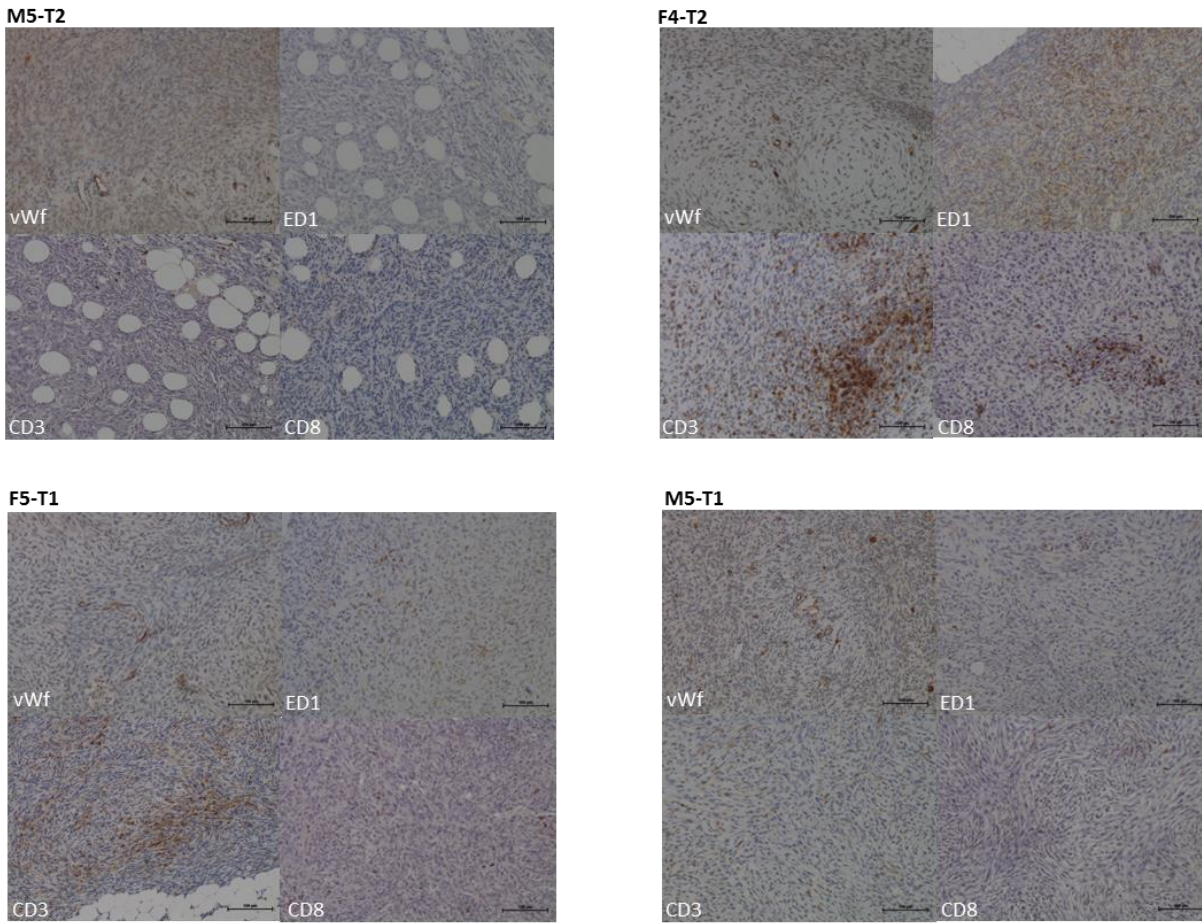
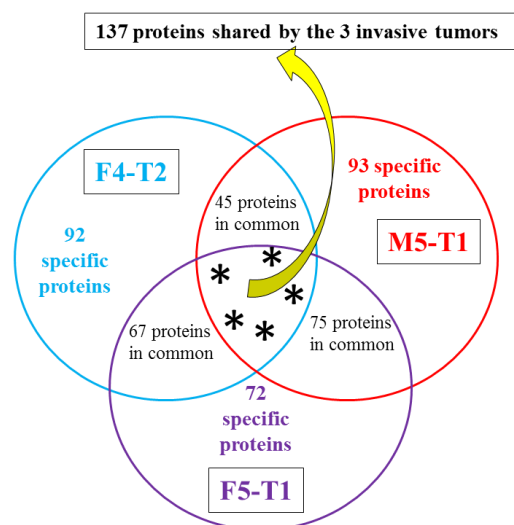


Figure 2. Distinctive features of the vascular and immune stroma of the four models of experimental malignant mesotheliomas. Immunohistochemical evaluation of blood vessels density and size (vWf: von Willebrand factor), and of the macrophagic (ED1) and T-lymphocytic (CD3 and CD8) infiltration of the tumor stroma. The four models displayed distinctive characteristics: the M5-T2 tumors display a moderate blood vessel density and a low T lymphocytic and macrophagic infiltration of the stroma; the F4-T2 and F5-T1 neoplasms are characterized by a moderate angiogenic activity and a marked to severe infiltration of the tumor stroma by macrophages and T-lymphocytes, particularly CD8+; the M5-T1 tumors are characterized by a high vascular density and a low T lymphocytes and macrophages infiltration, particularly of the center of the nodules, with immune cells mostly located at the periphery of the neoplastic tissue.

A



B

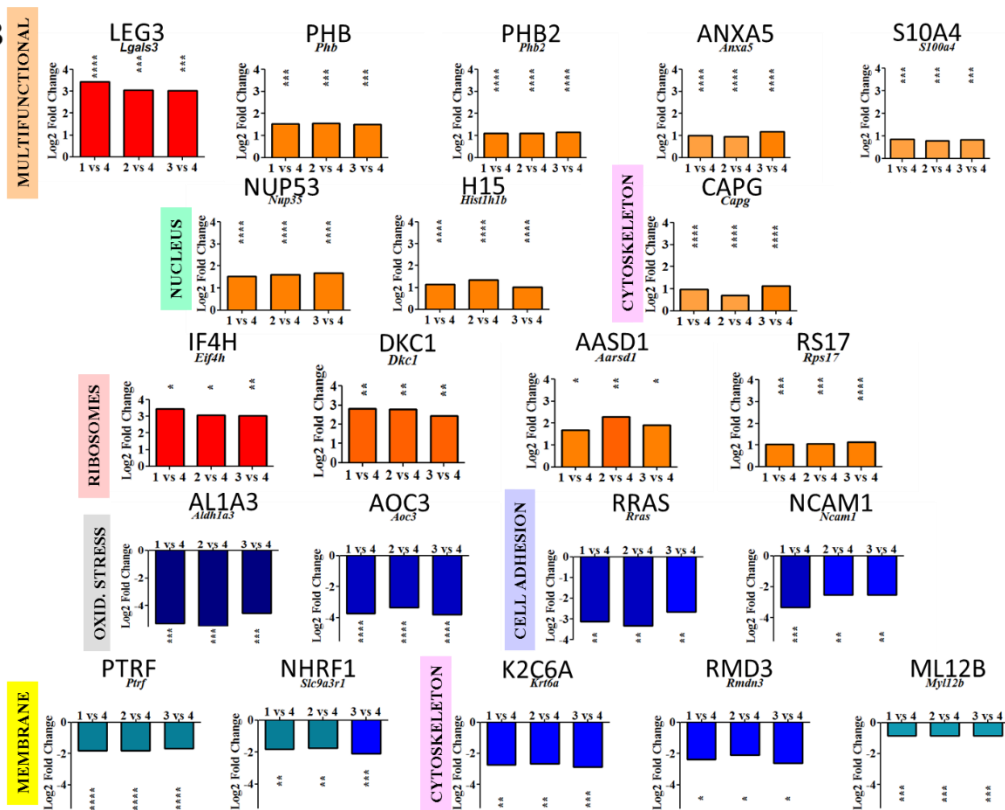
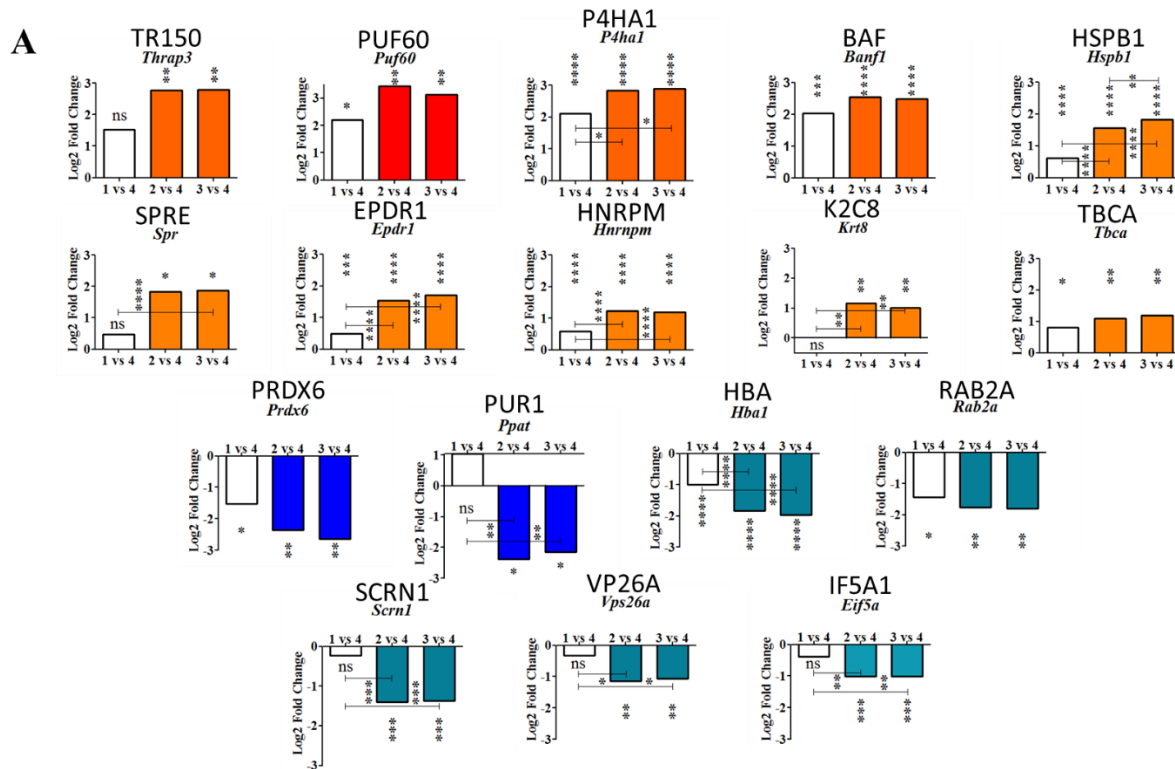


Figure 3. Proteins associated with the acquisition of invasive properties. (A), Schematic representation of the number of proteins analyzed in the comparison between the the invasive tumors, F4-T2, F5-T1 and M5-T1 (M5-T2 noninvasive tumor as the reference). (B), Quantitative changes of the same order of magnitude shared by the three invasive tumors (main proteins from the list of 137 indicated in (A) and described in Table S1, restricted to p values < 0.05 for both MSstats and MarkerView statistical analyses). Correspondence between genes, protein codes and

names are given in Table S2. Log2FC on the bar graphs correspond to the Log2 fold change observed between the invasive tumors (**1** = F4-T2, **2** = F5-T1, **3** = M5-T1) relative to the noninvasive tumor (**4** = M5-T2). Colors illustrate the magnitude of Log2FC. Log2FC are given for the MSstats analysis together with the corresponding p values (* $0.01 < p < 0.05$; ** $0.001 < p < 0.01$; *** $0.0001 < p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).



B

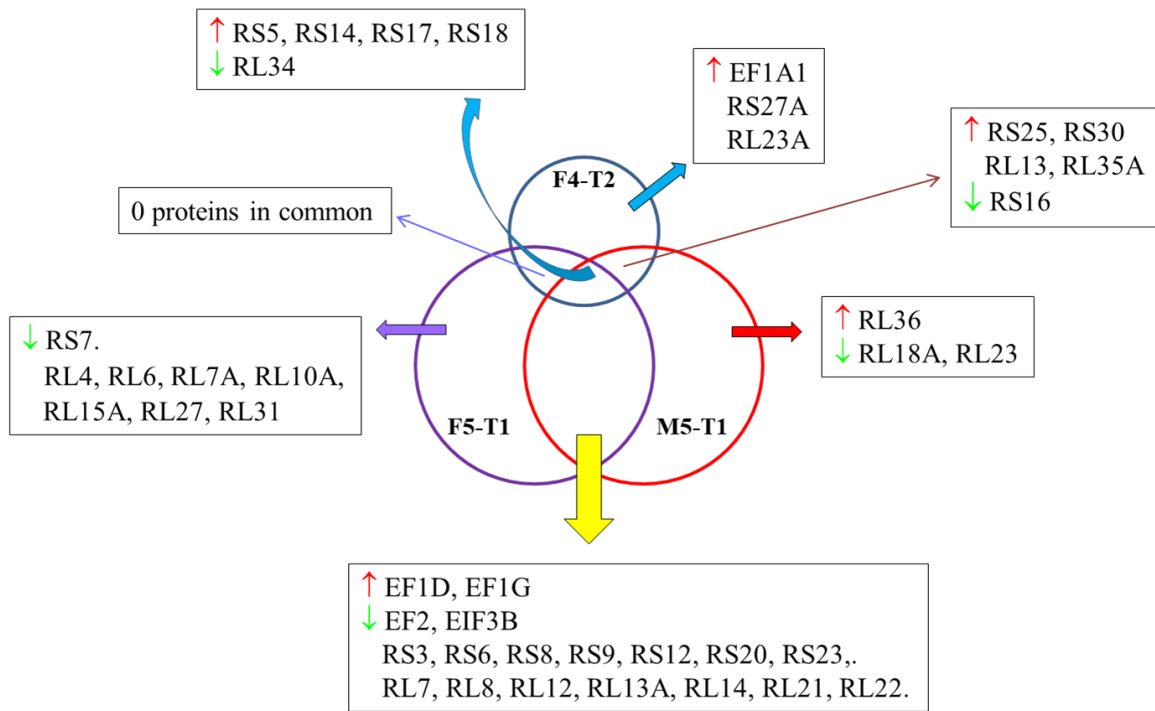


Figure 4. Changes associated with the increase in invasive properties. (A), Changes of the same order of magnitude (decrease or increase relative to the F4-T2 tumor) shared by the two most invasive tumors, F5-T1 and M5-T1. Log2FC corresponds to the Log2 fold change observed between the invasive tumors in comparison with the noninvasive tumor, M5-T2 (MSstats analysis and *p* values as indicated in Fig. 3B). Asterisks at the top of the bars correspond to the significance of the differences observed in comparison with the noninvasive M5-T2 tumor. When significant differences were also observed in the comparisons 1 vs 2, 1 vs 3, or 2 vs 3, *p* values were also indicated. Correspondence between genes, protein codes and names (from the list of 137 indicated in Fig. 3A) are given in Table S3. (B), Schematic representation of the differences and common features in the quantitative changes affecting ribosomal proteins in the three invasive tumors, F4-T2, F5-T1 and M5-T1 (M5-T2 noninvasive tumor as the reference).

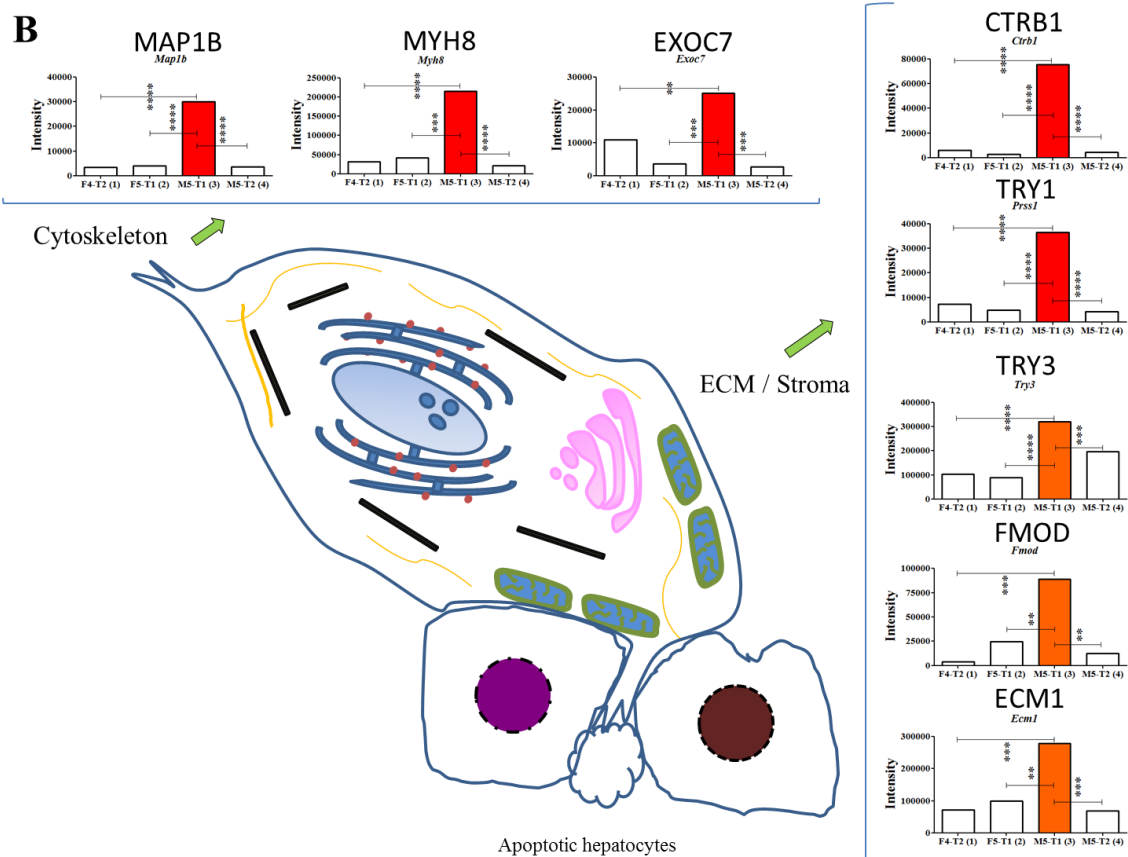
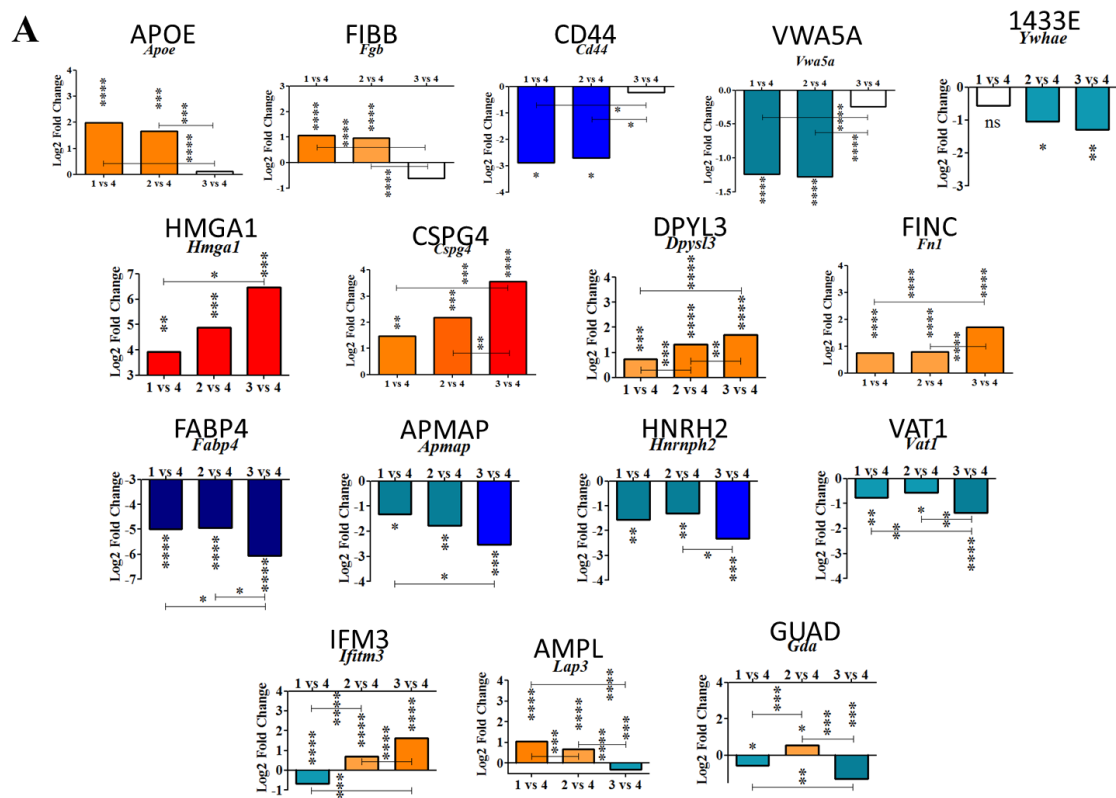


Figure 5. Specificities of the M5-T1 tumor. (A), Maximum changes (decrease or increase relative to the F4-T2 and F5-T1 tumors) observed specifically in the M5-T1 tumor. Log2FC corresponds to the Log2 fold change observed between the invasive tumors in comparison with the noninvasive tumor M5-T2 (MSstats analysis, same representation as in Figs. 3B and 4A). Asterisks at the top of the bars correspond to the significance of the differences observed in comparison with the noninvasive M5-T2 tumor. When significant differences were also observed in the comparisons **1 vs 2**, **1 vs 3**, or **2 vs 3**, *p* values were also indicated. Correspondence between genes, protein codes and names (from the list of 137 indicated in Fig. 3A) are given in Table S4. (B), Schematic representation of the most aggressive M5-T1 tumor, with comparative intensities (MarkerView statistical analysis) of the proteins concerned with the most significant changes (from the list of 93 proteins exhibiting significant quantitative changes only found in the M5-T1 tumor in comparison with the noninvasive tumor M5-T2, as indicated in Fig. 3A). Correspondence between genes, protein codes and names are given in Table S5.

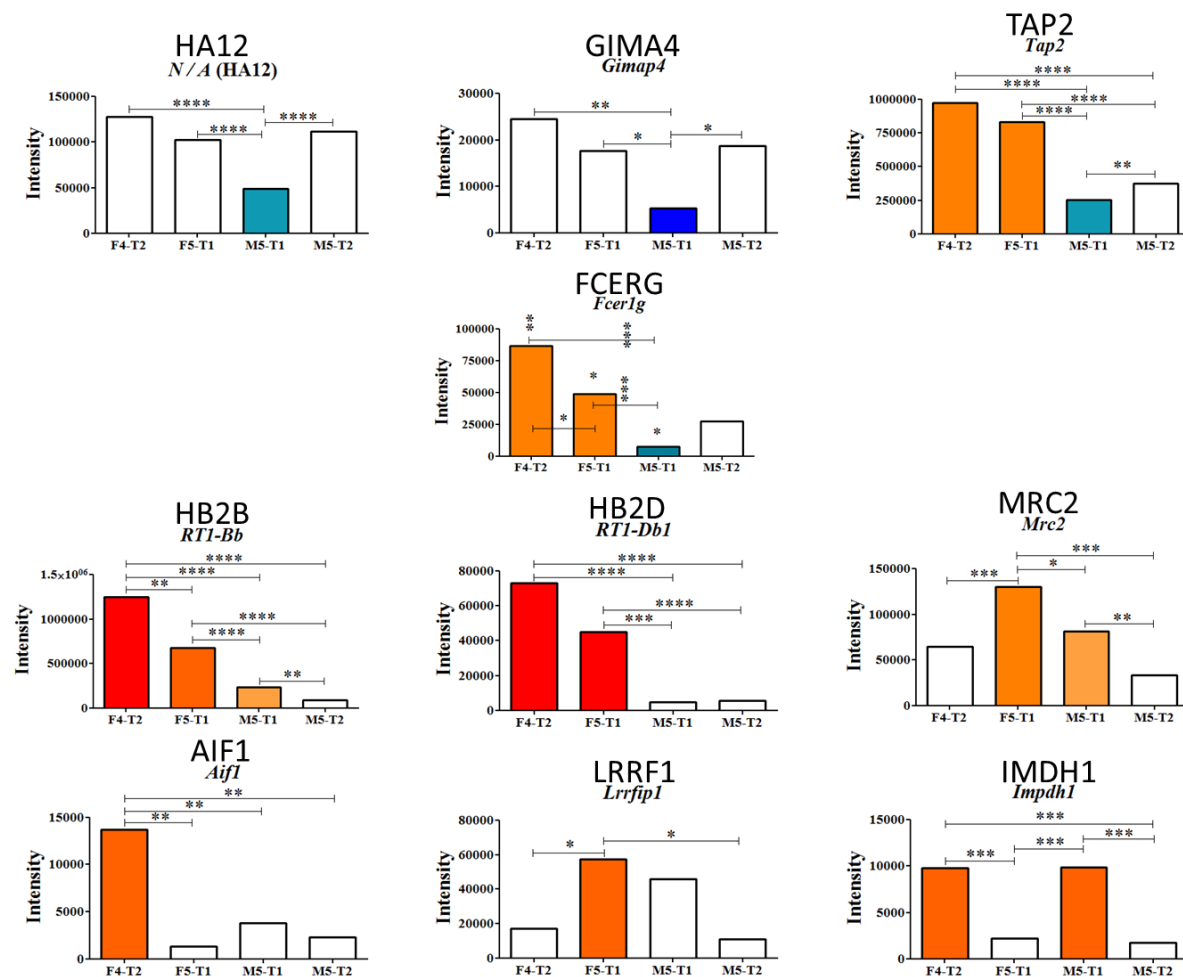


Figure 6. Potential immunological markers. Proteins of interest related to immunological processes showing differential intensities between tumors. Asterisks correspond to the significance of the differences, when observed, in the comparisons **1 vs 2**, **1 vs 3**, **1 vs 4**, **2 vs 3**, **2 vs 4** or **3 vs 4** (MarkerView statistical analysis). Correspondence between genes, protein codes and names are given in Table S7.

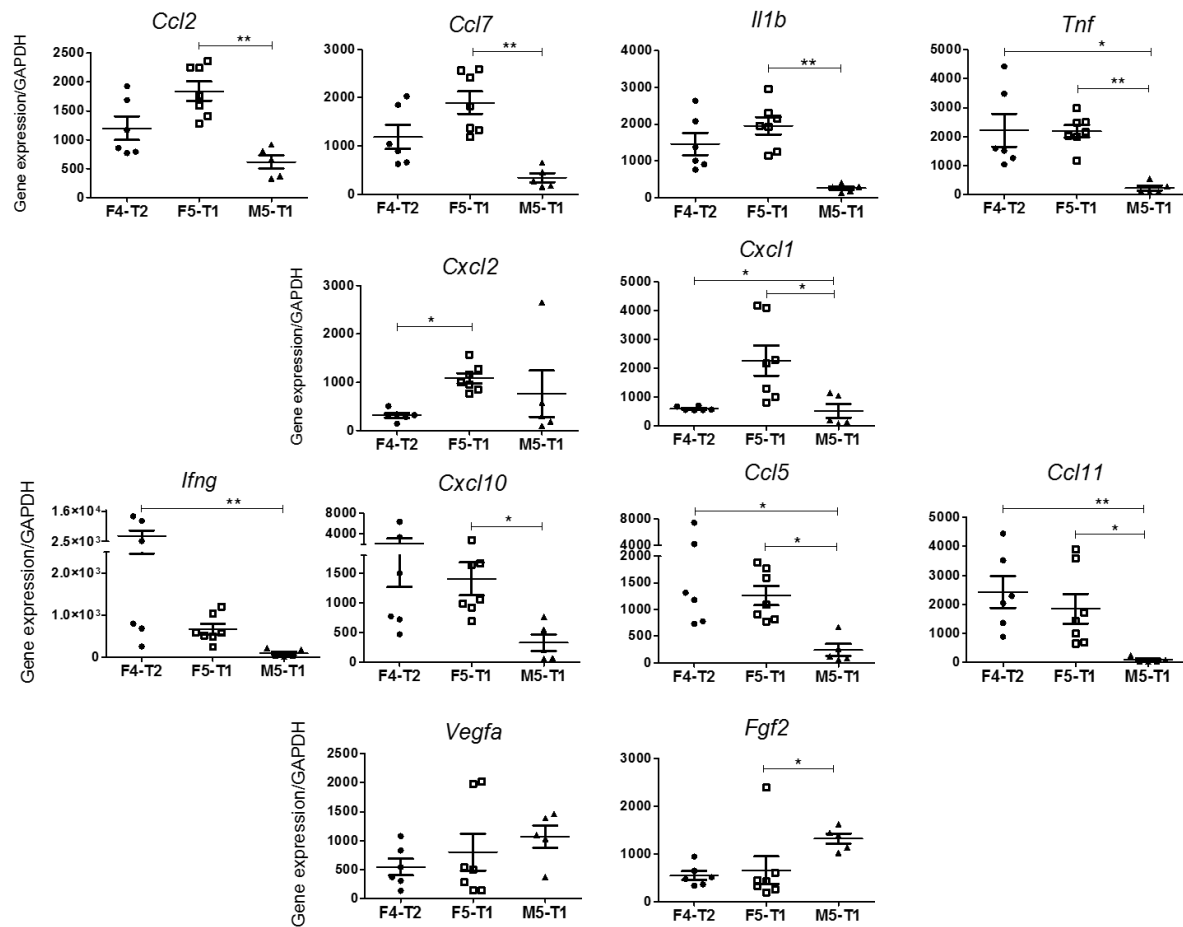


Figure 7. RT-PCR analysis of the expression of selected genes discriminating the three invasive tumors. Top row(s), genes presenting a maximal expression in the F5-T1 tumor, related to inflammatory process and/or macrophage infiltration. Middle row, genes presenting a maximal expression in the F4-T2 tumor, related to lymphocyte infiltration. Bottom row, genes expressing a maximal expression in the M5-T1 tumor.

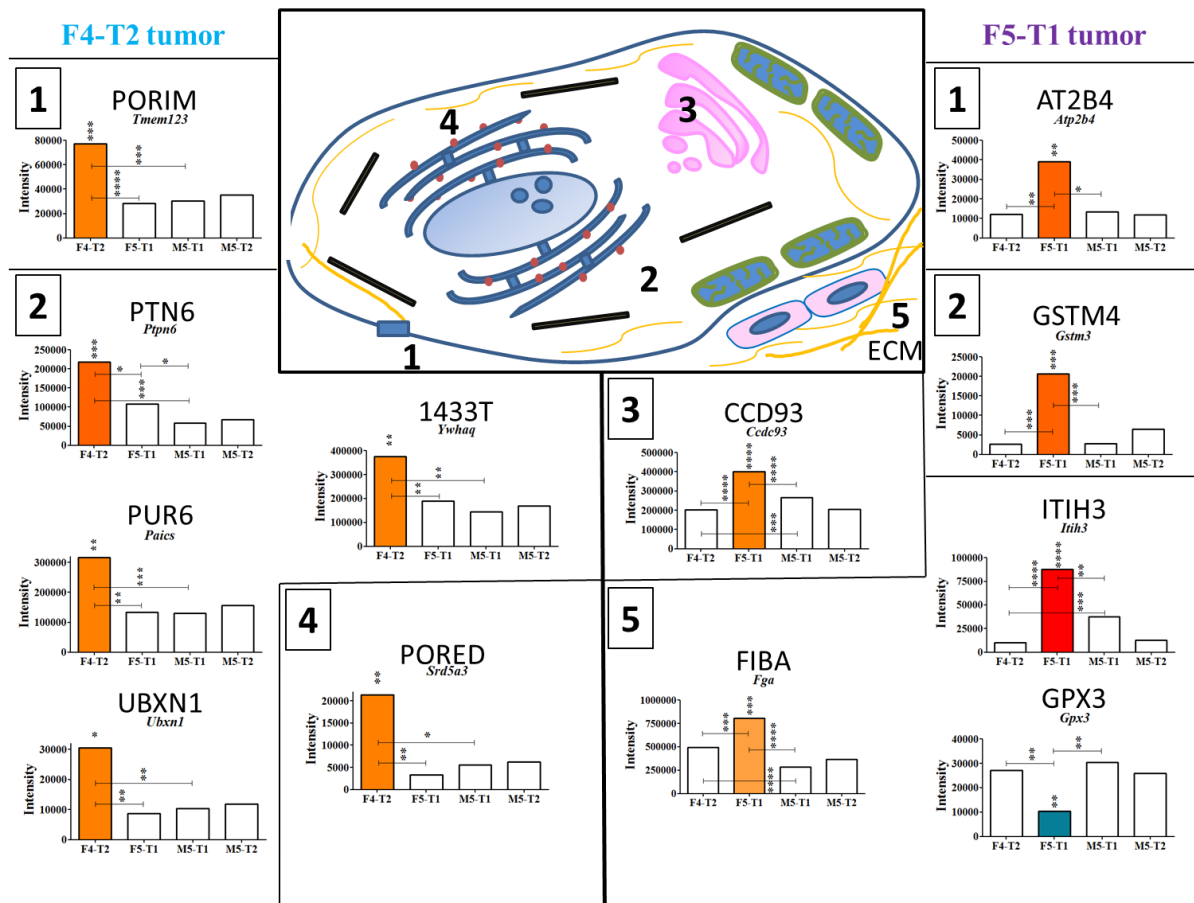


Figure 8. Main proteins exhibiting quantitative changes specific to F4-T2 or F5-T1. Comparative intensities (MarkerView statistical analysis), proteins of interest were selected from the lists of 92 or 72 exhibiting significant quantitative changes only found in the F4-T2 or F5-T1 tumor (in comparison with the noninvasive tumor M5-T2), as indicated in Fig. 3A. Asterisks at the top of the bars correspond to the significance of the differences observed in comparison with the noninvasive M5-T2 tumor. When significant differences were also observed in the comparisons 1 vs 2, 1 vs 3, or 2 vs 3, p values were also indicated. Colors illustrate the magnitude of Log2FC in the comparison of F4-T2 or F5-T1 vs M5-T2. Correspondence between genes, protein codes and names are given in Table S7.

LEGENDS TO SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplemental Table S1. Complete list of proteins presenting quantitative changes shared in common by the three invasive tumors (relative to the noninvasive M5-T2 tumor).

Code	Protein name
1433F	14-3-3 protein eta
AASD1	Alanyl-tRNA editing protein Aarsd1
ACADL	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
ACSL1	Long-chain-fatty-acid—CoA ligase 1
ACTN1	Alpha-actinin-1
AKAP2	A-kinase anchor protein 2
AL1A3	Aldehyde dehydrogenase family 1 member A3
ALBU	Serum albumin
AL7A1	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase
AMPL	Cytosol aminopeptidase
ANM1	Protein arginine N-methyltransferase 1
ANXA2	Annexin A2
ANXA4	Annexin A4
ANXA5	Annexin A5
ANXA8	Annexin A8
AOC3	Membrane primary amine oxidase
APMAP	Adipocyte plasma membrane-associated protein
ARFG3	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 3
BAF	Barrier-to-autointegration factor
BCAT2	Branched-chain-amino-acid aminotransferase, mitochondrial
CAH3	Carbonic anhydrase 3
CALM	Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly
CAPG	Macrophage-capping protein
CBPQ	Carboxypeptidase Q
CO1A2	Collagen alpha-2(I) chain
CO4	Complement C4
COR1A	Coronin-1A
COX2	Cytochrome c oxidase subunit 2
COX5B	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial
CRYAB	Alpha-crystallin B chain
CSPG4	Chondroitin sulfate proteoglycan 4
DAPK3	Death-associated protein kinase 3
DCPS	M7GpppX diphosphatase
DDAH1	N(G), N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1
DKC1	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4
DPEP1	Dipeptidase 1
DPYL3	Dihydropyrimidinase-related protein 3
ECHD1	Ethylmalonyl-CoA decarboxylase
EFTU	Elongation factor Tu, mitochondrial

EHD2	EH domain-containing protein 2
ENOA	Alpha-enolase
EPDR1	Mammalian ependymin-related protein 1
EZRI	Ezrin
FABP4	Fatty acid-binding protein, adipocyte
FAS	Fatty acid synthase
FCERG	High affinity immunoglobulin epsilon receptor subunit gamma
FIBG	Fibrinogen gamma chain
FINC	Fibronectin
FKBP1A	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A
FUBP2	Far upstream element-binding protein 2
G3P	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GPDA	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic
GUAD	Guanine deaminase
H15	Histone H1.5
H2AJ	Histone H2A.J
HB2B	Rano class II histocompatibility antigen, B-1 beta chain
HBA	Hemoglobin subunit alpha-1/2
HBB1	Hemoglobin subunit beta-1
HCD2	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2
HEMO	Hemopexin
HMGA1	High mobility group protein HMG-1 / HMG
HNRH2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 2
HNRPM	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M
HSPB1	Heat shock protein beta-1
IF2A	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1
IF4H	Eukaryotic translation initiation factor 4H
IF6	Eukaryotic translation initiation factor 6
IFM3	Interferon-induced transmembrane protein 3
K2C6A	Keratin, type II cytoskeletal 6A
KPYM	Pyruvate kinase
LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain
LEG3	Galectin-3
LMNA	Prelamin-A/C
MDHM	Malate dehydrogenase, mitochondrial
METK2	S-adenosylmethionine synthase isoform type-2
ML12B	Myosin regulatory light chain 12B
MOES	Moesin
MYH9	Myosin 9
MYH10	Myosin-10
MYH11	Myosin-11
MYL6	Myosin light polypeptide 6
MYO1C	Unconventional myosin 1C
NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1
NDRG1	Protein NDRG1
NEDD4	E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4

NHRF1	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1
NUP53	Nucleoporin
OAT	Ornithine aminotransferase, mitochondrial
P4HA1	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1
PA1B2	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit β
PDIA4	Protein disulfide-isomerase A4
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1
PHB	Prohibitin
PHB2	Prohibitin-2
PLEC	Pleckstrin homology-like domain family B member 1 (Fragment)
PLP2	Proteolipid protein 2
PP1G	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit
PRDX2	Peroxiredoxin-2
PRDX6	Peroxiredoxin-6
PROF1	Profilin-1
PRS7	26S protease regulatory subunit 7
PSB10	Proteasome subunit beta type-10
PTGIS	Prostacyclin synthase
PTRF	Polymerase I and transcript release factor
QKI	Protein quaking
RAB2A	Ras-related protein Rab-2A
RACK1	Receptor of activated protein C kinase 1
RB11B	Ras-related protein Rab-11B
RL34	60S ribosomal protein L34
RMD3	Regulator of microtubule dynamics protein 3
RRAS	Ras-related protein R-Ras
RS14	40S ribosomal protein S14
RS17	40S ribosomal protein S17
RS18	40S ribosomal protein S18
RS20	40S ribosomal protein S20
02-Sept	Septin-2
SAHH	Adenosylhomocysteinase
SBP1	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial
SCPDL	Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase
SPTN1	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1
S10A4	Protein S100-A4
S10A6	Protein S100-A6
S10AA	Protein S100-A10
SYUG	Gamma-synuclein
TAGL	Transgelin
TAGL2	Transgelin-2
TAP2	Antigen peptide transporter
TBB2A	Tubulin beta-2A chain
TBCA	Tubulin-specific chaperone A
TPM3	Tropomyosin alpha-3 chain
UB2V2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2

UBA1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1
UGGG1	UDP-glucose : glycoprotein glucosyltransferase 1
VAMP8	Vesicle-associated membrane protein 8
VAT1	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1
VTDB	Vitamin D-binding protein
WDR81	WD repeat-containing protein 81

Supplemental Table S2. Selected list of proteins presenting main quantitative changes of the same order of magnitude shared in common by the three invasive tumors (relative to the noninvasive M5-T2 tumor).

Gene	Protein	Name
<i>Aarsd1</i>	AASD1	Alanyl-tRNA editing protein Aarsd1
<i>Aldh1a3</i>	AL1A3	Aldehyde dehydrogenase family 1 member A3
<i>Anxa5</i>	ANXA5	Annexin A5
<i>Aoc3</i>	AOC3	Membrane primary amine oxidase
<i>Capg</i>	CAPG	Macrophage-capping protein
<i>Dkc1</i>	DKC1	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4
<i>Hist1h1b</i>	H15	Histone H1.5
<i>Eif4h</i>	IF4H	Eukaryotic translation initiation factor 4H
<i>Krt6a</i>	K2C6A	Keratin, type II cytoskeletal 6A
<i>Lgals3</i>	LEG3	Galectin-3
<i>Myl12b</i>	ML12B	Myosin regulatory light chain 12B
<i>Ncam1</i>	NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1
<i>Slc9a3r1</i>	NHRF1	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1
<i>Nup35</i>	NUP53	Nucleoporin
<i>Phb</i>	PHB	Prohibitin
<i>Phb2</i>	PHB2	Prohibitin-2
<i>Ptrf</i>	PTRF	Polymerase I and transcript release factor
<i>Rmdn3</i>	RMD3	Regulator of microtubule dynamics protein
<i>Rras</i>	RRAS	Ras-related protein R-Ras
<i>Rps17</i>	RS17	40S ribosomal protein S17
<i>S100a4</i>	S10A4	Protein S100-A4

Supplemental Table S3. Main proteins exhibiting quantitative changes of the same order of magnitude (relative to the noninvasive M5-T2 tumor) shared in common by the two most invasive tumors, F5-T1 and M5-T1 (increase or decrease of Log2FC compared with the F4-T2 tumor).

Gene	Protein	Name
<i>Banf1</i>	BAF	Barrier-to-autointegration factor
<i>Epdr1</i>	EPDR1	Mammalian ependymin-related protein 1
<i>Hba1</i>	HBA	Hemoglobin subunit alpha-1/2
<i>Hnrpm</i>	HNRPM	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M
<i>Hspb1</i>	HSPB1	Heat shock protein beta-1
<i>Eif5a</i>	IF5A1	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1
<i>Krt8</i>	K2C8	Keratin, type II cytoskeletal 8
<i>P4ha1</i>	P4HA1	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1
<i>Prdx6</i>	PRDX6	Peroxiredoxin-6
<i>Puf60</i>	PUF60	Poly(U)-binding-splicing factor PUF60
<i>Ppat</i>	PUR1	Amidophosphoribosyltransferase
<i>Rab2a</i>	RAB2A	Ras-related protein Rab-2A
<i>Scrn1</i>	SCRN1	Secernin-1
<i>Spr</i>	SPRE	Sepiapterin reductase
<i>Tbca</i>	TBCA	Tubuline-specific chaperone A

<i>Thrap3</i>	TR150	Thyroid hormone receptor-associated protein 3
<i>Vps26a</i>	VP26A	Vacuolar protein sorting-associated protein 26A

Supplemental Table S4. Main proteins exhibiting maximal quantitative changes (relative to the noninvasive M5-T2 tumor) specific to the most invasive tumor, M5-T1 (increase or decrease of Log2FC compared with F4-T2 and F5-T1 tumors).

Gene	Protein	Name
<i>Ywhae</i>	1433E	14-3-3 protein epsilon
<i>Lap3</i>	AMPL	Cytosol aminopeptidase
<i>Apmmap</i>	APMAP	Adipocyte plasma membrane-associated protein
<i>Apoe</i>	APOE	Apolipoprotein E
<i>Cd44</i>	CD44	CD44 antigen
<i>Cspg4</i>	CSPG4	Chondroitin sulfate proteoglycan 4
<i>Dpyls3</i>	DPYL3	Dihydropyrimidinase-related protein 3
<i>Fabp4</i>	FABP4	Fatty acid-binding protein adipocyte
<i>Fgb</i>	FIBB	Fibrinogen beta chain
<i>Fn1</i>	FINC	Fibronectin
<i>Gda</i>	GUAD	Guanine deaminase
<i>Hmga1</i>	HMGA1	High mobility group protein HMG-1 / HMG-Y
<i>Hnrnph2</i>	HNRH2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 2
<i>Ifitm3</i>	IFM3	Interferon-induced transmembrane protein 3
<i>Vat1</i>	VAT1	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog
<i>Vwa5a</i>	VWA5A	von Willebrand factor A domain-containing protein 5A

Supplemental Table S5. Main proteins (from the complementary list) affected by quantitative changes (relative to the noninvasive M5-T2 tumor) only significant for the M5-T1 tumor ($p > 0.05$ for both F4-T2 and F5-T1 tumors).

Gene	Protein	Name
<i>Ctrb1</i>	CTRB1	Chymotrypsinogen B
<i>Ecm1</i>	ECM1	Extracellular matrix protein 1
<i>Exoc7</i>	EXOC7	Exocyst complex component 7
<i>Fmod</i>	FMOD	Fibromodulin
<i>Map1b</i>	MAP1B	Microtubule-associated protein 1B
<i>Myh8</i>	MYH8	Myosin-8
<i>Prss1</i>	TRY1	Anionic trypsin-1
<i>Try3</i>	TRY3	Cationic trypsin-3

Supplemental Table S6. Proteins of interest corresponding to potential immunological markers, showing differential intensities between tumors.

Gene	Protein	Name
<i>Aif1</i>	AIF1	Allograft inflammatory factor 1
<i>Fcer1g</i>	FCERG	High-affinity immunoglobulin epsilon receptor subunit gamma
<i>Gimap4</i>	GIMA4	GTPase IMAF family member 4
<i>N/A</i>	HA12	RT1 Class I histocompatibility antigen, AA alpha chain
<i>RT1-Bb</i>	HB2B	Rano class II histocompatibility antigen, B-1 beta chain
<i>RT1-Db1</i>	HB2D	Rano class II histocompatibility antigen, D-1 beta chain
<i>Impdh1</i>	IMDH1	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 1
<i>Lrrfip1</i>	LRRF1	Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1
<i>Mrc2</i>	MRC2	C-type mannose receptor 2
<i>Tap2</i>	TAP2	Antigen peptide transporter 2

Supplemental Table S7. Main proteins (from complementary lists) affected by quantitative changes (relative to the noninvasive M5-T2 tumor) only significant for the F4-T2 (left) or F5-T1 (right) tumors ($p < 0.05$). The list was restricted to cytosolic, ER, membrane or ECM proteins presenting a potential link with immunological findings as shown in Figs 2, 6, 7 and Tables S6 and S7.

Gene	Protein	Name
<i>Ywhaq</i>	1433T	14-3-3 protein theta
<i>Srd5a3</i>	PORED	Polyprenol reductase
<i>Tmem123</i>	PORIM	Porimin
<i>Ptpn6</i>	PTN6	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6
<i>Paics</i>	PUR6	Multifunctional protein ADE2
<i>Ubxn1</i>	UBXN1	UBX domain-containing protein 1
<i>At2b4</i>	AT2B4	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4
<i>Ccdc93</i>	CCD93	REVERSED Coiled-coil domain-containing protein 93
<i>Fga</i>	FIBA	Fibrinogen alpha chain
<i>Fkbp9</i>	FKBP9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP9
<i>Gpx3</i>	GPX3	Glutathione peroxidase 3
<i>Gstm3</i>	GSTM4	Glutathione S-transferase Yb-3
<i>Itih3</i>	ITIH3	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3

References

1. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012; 21: 309-322.
2. Luo Z, Wang Q, Lau BW, Lau B, Xu L, Zhao L, Yang H, Feng M, Xuan Y, Yang Y, Lei L, Wang C, et al. Tumor microenvironment: the culprit for ovarian cancer metastasis. *Cancer Lett*. 2016; 377: 174-182.
3. Pinton G, Manente AG, Tavian D, Moro L, Mutti L. Therapies currently in phase II trials for malignant pleural mesothelioma. *Expert Opin Investig Drugs*. 2013; 22: 1255-1263.
4. Pein M, Oskarsson T. Microenvironment in metastasis: roadblocks and supportive niches. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2015; 309: C627-C638.
5. Martin M, Wei H, Lu T. Targeting microenvironment in cancer therapeutics. *Oncotarget*. 2016; 32: 52575-52583.
6. Catalano V, Turdo A, Di Franco S, Dieli F, Todaro M, Stassi G. Tumor and its microenvironment: a synergistic interplay. *Semin Cancer Biol*. 2013; 23P: 522-532.
7. Attieh Y, Vignjevic DM. The hallmarks of CAFs in cancer invasion. *Eur J Cell Biol*. 2016; 95: 493-502.
8. Finn OJ. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Ann Oncol*. 2012; 23: vii6-vii9.
9. Pfirschke C, Engblom C, Rickelt S, Cortez-Retamozo V, Garriss C, Pucci F, Yamazaki T, Poirier-Colame V, Newton A, Redouane Y, Lin Y-J, Wojtkiewicz G, et al. Immunogenic chemotherapy sensitizes tumors to checkpoint blockade therapy. *Immunity*. 2016; 44: 343-354.
10. Johansson A, Hamzah J, Ganss R. More than a scaffold: stromal modulation of tumor immunity. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1865: 3-13.
11. Offringa R. Cancer immunotherapy is more than a numbers game. *Science*. 2006; 314: 68-69.
12. Schientiger A, Philip M, Krisnawan VE, Chiu EY, Delrow JJ, Basom RS, Lauer P, Brockstedt DG, Knoblaugh SE, Hämmerling GJ, Schell TD, Garbi N, et al. Antigen-driven differentiation program initiated early during tumorigenesis. *Immunity*. 2016; 45: 389-401.
13. Joyce JA, Fearon DT. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science*. 2015; 348: 74-80.
14. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol*. 2012; 12: 253-268.

15. Galdiero MR, Garlanda C, Jaillon S, Marone G, Mantovani A. Tumor associated macrophages and neutrophils in tumor progression. *J Cell Physiol.* 2013; 228: 1404-1412.
16. Chow A, Brown BD, Merad M. Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11: 788-798.
17. Kumar V, Cheng P, Condamine T, Mony S, Languino LR, McCaffrey JC, Hockstein N, Guarino M, Masters G, Penman E, Denstman F, Xu X, et al. CD45 phosphatase inhibits STAT3 transcription factor activity in myeloid cells and promotes tumor-associated macrophage differentiation. *Immunity.* 2016; 44: 303-315.
18. van der Bij GJ, Bögels M, Oosterling SJ, Kroon J, Schuckmann DT, de Vries HE, Meijer S, Beelen RH, van Egmond M. Tumor infiltrating macrophages reduce development of peritoneal colorectal carcinoma metastases. *Cancer Lett.* 2008; 262: 77-86.
19. Mantovani A. Reflections on immunological nomenclature: in praise of imperfection. *Nat Immunol.* 2016; 17: 215-216.
20. Ginhoux F, Schultze JL, Murray PJ, Ochando J, Biswas SK. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nat Immunol.* 2016; 17: 34-40.
21. Roulois D, Deshayes S, Guilly MN, Nader JS, Liddell C, Robard M, Hulin P, Ouacher A, Le Martelot V, Fonteneau JF, Grégoire M, Blanquart C, et al. Characterization of preneoplastic and neoplastic rat mesothelial cell lines: the involvement of TETs, DNMTs, and 5-hydroxymethylcytosine. *Oncotarget.* 2016; 7: 34664-346687.
22. Gao Y, Wang X, Sang Z, Li Z, Liu F, Mao J, Yan D, Zhao Y, Wang H, Li P, Ying X, Zhang X, et al. Quantitative proteomics by SWATH-MS reveals sophisticated metabolic reprogramming in hepatocellular carcinoma tissues. *Sci Rep.* 2017; 7: 45913.
23. Song L, Tang J-w, Owusu L, Sun M-Z, Wu J, Zhang J. Galectin-3 in cancer. *Clin Chim Acta.* 2014; 431: 185-191.
24. Fortuna-Costa A, Gomes AM, Kozlowski EO, Stelling MP, Pavão MSG. Extracellular galectin-3 in tumor progression and metastasis. *Front Oncol.* 2014; 4: 138.
25. Cardoso AC, Andrade LN, Bustos SO, Chammass R. Galectin-3 determines tumor cell adaptative strategies in stressed tumor microenvironments. *Front Oncol.* 2016; 6:127.
26. Ruvolo PP. Galectin-3 as a guardian of the tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta.* 2016; 1863: 427-437.

27. Xu S, Powers MA. Nuclear pore proteins and cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2009; 20: 620-630.
28. Khachaturov V, Xiao G-Q, Kinoshita Y, Unger PD, Burstein DE. Histone H1.5, a novel prostatic cancer marker: an immunohistochemical study. *Human Pathol.* 2014; 45: 2115-2119.
29. Cao Y, Liang H, Zhang F, Luan Z, Zhao S, Wang X-A, Liu S, Bao R, Shu Y, Ma Q, Zhu J, Liu Y. Prohibitin overexpression predicts poor prognosis and promotes cell proliferation and invasion through ERK pathway activation in gallbladder cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016; 35: 68.
30. Peng B, Guo C, Guan H, Liu S, Sun M-Z. Annexin A5 as a potential marker in tumors. *Clin Chim Acta.* 2014; 427: 42-48.
31. Bresnick AR, Weber DJ, Zimmer DB. S100 proteins in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015; 15: 96-109.
32. Dimou A, Neumeister V, Agarwal S, Anagnostou V, Syrigos K, Rimm DL. Measurement of aldehyde dehydrogenase 1 expression defines a group with better prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Am J Pathol.* 2012; 181: 1436-1442.
33. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43: D447-D452.
34. Toninello A, Pietrangeli P, De Marchi U, Salvi M, Mondovi B. Amine oxidases in apoptosis and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1765: 1-13.
35. Liu WN, Yan M, Chan AM. A thirty-year quest for a role of R-Ras in cancer: from an oncogene to a multitasking GTPase. *Cancer Lett.* 2017; 305: 862-865.
36. Zecchini S, Cavallaro U. Neural cell adhesion molecule in cancer: expression and mechanisms. In: V. Berezin (ed.), *Structure and function of the neural cell adhesion molecule NCAM, Advances in experimental medicine and biology*. DOI 10.1007/978-1-4419-1170-4_20, Springer Science + Business Media, LLC 2010, pp 319-333.
37. Wang F, Zheng Y, Orange M, Yang C, Yang B, Liu J, Tan T, Ma X, Chen T, Yin X, Tang X, Zhu H. PTRF suppresses the progression of colorectal cancers. *Oncotarget.* 2017; 8: 48650-48659.
38. Webb BA, Chimenti M, Jacobson MP, Barber DL. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nat Rev.* 2011; 11: 671-677.

39. Glaser J, Neumann MHD, Mei Q, Betz B, Seier N, Beyer I, Fehm T, Neubauer H, Niederacher D, Fleisch MC. Macrophage capping protein Cap G is a putative oncogene involved in migration and invasiveness in ovarian carcinoma. *BioMed Res Int*. 2014; 2014: 379847.
40. Park I, Han C, Jin S, Lee B, Choi H, Kwon JT, Kim D, Kim J, Lifirsu E, Park WJ, Park ZY, Kim DH, Cho C. Myosin regulatory light chains are required to maintain the stability of myosin II and cellular integrity. *Biochem J*. 2011; 434: 171-180.
41. Karantza V. Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene*. 2011; 30: 127-138.
42. Stefansson IM, Salvesen HB, Akslen LA. Loss of p63 and cytokeratin 5/6 expression is associated with more aggressive tumors in endometrial carcinoma patients. *Int J Cancer*. 2006; 118: 1227-1233.
43. Pouliquen DL, Nawrocki-Raby B, Nader J, Blandin S, Robard M, Birembaut P, Grégoire M. Evaluation of intracavitary administration of curcumin for the treatment of sarcomatoid mesothelioma. *Oncotarget*. 2017; 8: 57552-57573.
44. Gomez-Suaga P, Paillusson S, Miller CC. ER-mitochondria signaling regulates autophagy. *Autophagy*. 2017; 13: 1250-1251.
45. Gorjanacz M. Nuclear assembly as a target for anti-cancer therapies. *Nucleus*. 2014; 5: 47-55.
46. Li J, Wang T, Pei L, Jing J, Hu W, Sun T, Liu H. Expression of VRK1 and the downstream gene BANF1 in oesophageal cancer. *Biomed Pharmacoth*. 2017; 89: 1086-1091.
47. Han SP, Tang YH, Smith R. Functional diversity of the hnRNAs ; past, present and perspectives. *Biochem J*. 2010; 430: 379-392.
48. Thomas P, Forse RA, Bajenova O. Carcinoembryonic antigen (CEA) and its receptor hnRNP M are mediators of metastasis and the inflammatory response in the liver. *Clin Exp Metastasis*. 2011; 28: 923-932.
49. Heyd F, Lynch KW. Phosphorylation-dependent regulation of PSF by GSK3 controls CD45 alternative splicing. *Mol Cell*. 2010; 40: 126-137.
50. Beli P, Lukashchuk N, Wagner SA, Weinert BT, Olsen JV, Baskcomb L, Mann M, Jackson SP, Choudhary C. Proteomic investigations reveal a role for RNA processing factor THRAP3 in the DNA damage response. *Mol. Cell*. 2012; 46: 212-225.
51. Singh B, Eyras E. The role of alternative splicing in cancer. *Transcription*. 2017; 8: 91-98.
52. Kobayashi S, Hoshino T, Hiwasa T, Satoh M, Rahmutulla B, Tsuchida S, Komukai Y, Tanaka T, Matsubara H, Shimada H, Nomura F, Matsuchita K. Anti-FIRs (PUF60) auto-antibodies

- are detected in the sera of early-stage colon cancer patients. *Oncotarget*. 2016; 7: 82493-82503.
53. Zhou X, Liao W-J, Liao J-M, Liao P, Lu H. Ribosomal proteins: functions beyond the ribosome. *J Mol Cell Biol*. 2015; 7: 92-104.
 54. Ali MU, Ur Rahman MS, Jia Z, Jiang C. Eukaryotic translation initiation factors and cancer. *Tumor Biol*. 2017; 39: 1010428317709805.
 55. Stöcker S, van Laer K, Mijuskovic A, Dick TP. The conundrum of hydrogen peroxide signaling and the emerging role of peroxiredoxins as redox relay hubs. *Antiox Redox Signal*. 2017; doi: 10.1089/ars.2017.7162.
 56. Nicolussi A, D’Inzeo S, Capalbo C, Giannini G, Coppa A. The role of peroxiredoxins in cancer. *Mol Clin Oncol*. 2017; 6: 139-153.
 57. Arrigo A-P. Mammalian HspB1 (Hsp27) is a molecular sensor linked to the physiology and environment of the cell. *Cell Stress Chaperones*. 2017; 22: 517-529.
 58. Calderwood SK, Gong J. Heat shock proteins promote cancer: It’s a protection racket. *Trends Biochem Sci*. 2016; 41: 311-323.
 59. Lopez-Fanarraga M, Avila J, Guasch A, Coll M, Zabala JC. Postchaperonin tubulin folding cofactors and their role in microtubule dynamics. *J Struct Biol*. 2001; 135: 219-229.
 60. Zhang P, Ma X, Song E, Chen W, Pang H, Ni D, Gao Y, Fan Y, Ding Q, Zhang Y, Zhang X. Tubulin cofactor A functions as a novel positive regulator of ccRCC progression, invasion and metastasis. *Int J Cancer*. 2013; 133: 2801-2811.
 61. Zhang XY, Hong SS, Zhang M, Cai QQ, Zhang MX, Xu CJ. Proteomic alterations of fibroblasts induced by ovarian cancer cells reveal potential cancer targets. *Neoplasma*. doi: 10.4149/neo_2018_101.
 62. Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009; 10: 513-525.
 63. Geisler C, Gaisa NT, Pfister D, Fuessel S, Kristiansen G, Braunschweig T, Gostek S, Beine B, Diehl HC, Jackson AM, Borchers CH, Heidenreich A, et al. Identification and validation of potential new biomarkers for prostate cancer diagnosis and prognosis using 2D-DIGE and MS. *BioMed Res Int*. 2015; 2015: 454256.
 64. Cho Y-R, Kim SH, Ko HY, Kim M-D, Choi SW, Seo D-W. Sepiapterin inhibits cell proliferation and migration of ovarian cancer cells via down-regulation of p70^{S6K}-dependent VEGFR-2 expression. *Oncol Rep*. 2011; 26: 861-867.

65. Xiong G, Deng L, Zhu J, Rychahou PG, Xu R. Prolyl-4-hydroxylase α subunit 2 promotes breast cancer progression and metastasis by regulating collagen deposition. *BMC Cancer*. 2014; 14:1.
66. Nimmrich I, Erdmann S, Melchers U, Chtarbova S, Finke U, Hentsch S, Hoffmann I, Oertel M, Hoffmann W, Müller O. The novel ependymin related gene UCC1 is highly expressed in colorectal tumor cells. *Cancer Lett*. 2001; 16: 71-79.
67. Zhang Q, Wang Y. HMG modifications and nuclear function. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1799: 28.
68. Han, S.P., Tang, Y.H., Smith, R. Functional diversity of the hnRNAs; past, present and perspectives. *Biochem J*. 2010; 430: 379-392.
69. Stark M, Bram EE, Akerman M, Mandel-Gutfreund Y, Assaraf YG. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1/H2-dependent unslicing of thymidine phosphorylase results in anticancer drug resistance. *J Biol Chem*. 2011; 286: 3741-3754.
70. Chew SH, Okazaki Y, Nagai H, Misawa N, Akatsuka S, Yamashita K, Jiang L, Yamashita Y, Noguchi M, Hosoda K, Sekido Y, Takahashi T, et al. Cancer-promoting role of adipocytes in asbestos-induced mesothelial carcinogenesis through dysregulated adipocytokine production. *Carcinogenesis*. 2014; 35: 164-172.
71. Zhang Y, Sun Y, Yan F, Li Q, Zhang Y, Silverstein KAT, Liu S, Sauter E, Cleary MP, Li B. Fatty acid binding E-FABP restricts tumor growth by promoting IFN γ responses in tumor-associated macrophages. *Cancer Res*. 2014; 74: 2986-2998.
72. Mishra S, Nyomba BG. Prohibitin – at the crossroads of obesity-linked diabetes and cancer. *Exp Biol Med*. 2017; 242: 1170-1177.
73. Xu X, Wan J, Yuan L, Ba J, Feng P, Long W, Huang H, Liu P, Cai Y, Liu M, Luo J, Li L. Serum levels of apolipoprotein E correlates with disease progression and poor prognosis in breast cancer. *Tumor Biol*. 2016; 37: 15959-15966.
74. Suzuki M, Takeda S, Teraoka-Nishitani N, Yamagata A, Tanaka T, Sasaki M, Yasuda N, Oda M, Okano T, Yamahira K, Nakamura Y, Kobayashi T, et al. Cadmium-induced malignant transformation of rat liver cells: potential key role and regulatory mechanism of altered apolipoprotein E expression in enhanced invasiveness. *Toxicology*. 2017; 382: 16-23.
75. Rho J-h, Ladd JJ, Li CI, Potter JD, Zhang Y, Shelley D, Shibata D, Coppola D, Yamada H, Toyoda H, Tada T, Kumada T, et al. Protein and glycomic plasma markers for early detection

- of adenoma and colon cancer. *Gut*. 2016; pii: gutjnl-312794. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312794.
76. Mendes M, Peláez-García A, López-Lucendo M, Bartolomé RA, Calviño E, Barderas R, Casal JI. Mapping the spatial proteome of metastatic cells in colorectal cancer. *Proteomics*. 2017; doi: 10.1002/pmic.201700094.
77. Günther E, Walter L. The major histocompatibility complex of the rat (*Rattus norvegicus*). *Immunogenetics*. 2001; 53: 520-542.
78. Leone P, Shin E-C, Perosa F, Vacca A, Dammacco F, Racanelli V. MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells. *J Natl Cancer Inst*. 2013; 105: 1172-1187.
79. Filén S, Lahesmaa R. GIMAP proteins in T-lymphocytes. *J Signal Transduction*. 2010; 2010: 268589.iecz
80. Huang Z, Zhang W, Gao C, Ji B, Chi X, Zheng W, Wang H. Dysregulation of GTPase IMAF family members in hepatocellular cancer. *Mol Med Reports*. 2016; 14: 4119-4123.
81. Kim E, Kwak H, Ahn K. Cytosolic aminopeptidases influence MHC class I-mediated antigen presentation in an allele-dependent manner. *J Immunol*. 2009; 183: 7379-7387.
82. Maeurer MJ, Gollin SM, Storkus WJ, Swaney W, Karbach J, Martin D, Castelli C, Salter R, Knuth A, Lotze MT. Tumor escape from immune recognition : loss of HLA-A2 melanoma cell surface expression is associated with a complex rearrangement of the short arm of chromosome 6. *Clin Cancer Res*. 1996; 2: 641-652.
83. Blank U, Charles N, Benhamou M. The high-affinity immunoglobulin E receptor as pharmacological target. *Eur J Pharmacol*. 2016; 778: 24-32.
84. Wieczorek M, Abualrous ET, Sticht J, Alvaro-Benito M, Stolzenberg S, Noé F, Freund C. Major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II proteins: conformational plasticity in antigen presentation. *Front Immunol*. 2017; 8: 292.
85. Yang M, Gao H, Chen P, Jia J, Wu S. Knockdown of interferon-induced transmembrane proteion 3 expression suppresses breast cancer cell growth and colony formation and affects the cell cycle. *Oncol Rep*. 2013; 30: 171-178.
86. Jia Y, Xiao Z, Jiang W, Chen G, Wang Z. Overexpression of IFITM3 predicts poor prognosis in stage IIA esophageal squamous cell carcinoma after Ivor Lewis esophagectomy. *Thorac Cancer*. 2017; 8: 592-599.

87. Zhang D, Wang H, He H, Niu H, Li Y. Interferon induced transmembrane protein 3 regulates the growth and invasion of human lung adenocarcinoma. *Thorac Cancer*. 2017; 8: 337-343.
88. Rolih V, Barutello G, Lussich S, De Maria R, Quaglino E, Buracco P, Cavallo F, Riccardo F. CSPG4: a prototype oncoantigen for translational immunotherapy studies. *J Transl Med*. 2017; 15:151.
89. Ocak S, Friedman DB, Chen H, Ausborn JA, Hassanein M, Detry B, Weynand B, Aboubakar F, Pilette C, Sibille Y, Massion PP. Discovery of new membrane-associated proteins overexpressed in small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2014; 9: 324-336.
90. Wang K, Seo BR, Fischbach C, Gourdon D. Fibronectin mechanobiology regulates tumorigenesis. *Cell Mol Bioeng*. 2016; 9: 1-11.
91. Xie Y, Chen L, Lv X, Hou G, Wang Y, Jiang C, Zhu H, Xu N, Wu L, Lou X, Liu S. The levels of serine proteases in colon tissue interstitial fluid and serum serve as an indicator of colorectal cancer progression. *Oncotarget*. 2016; 7: 32592-32606.
92. Mondal B, Patil V, Shwetha SD, Sravani K, Hegde AS, Arivazhagan A, Santosh V, Kanduri M, Somasundaram K. Integrative functional genomic analysis identifies epigenetically regulated fibromodulin as an essential gene for glioma cell migration. *Oncogene*. 2017; 36: 71-83.
93. Bergamaschi A, Tagliabue E, Sørlie T, Naume B, Triulzi T, Orlandi R, Russnes HG, Nesland JM, Tammi R, Auvinen P, Kosma V-M, Ménard S, et al. Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. *J Pathol*. 2008; 214: 357-367.
94. Lal G, Hashimi S, Smith BJ, Lynch CF, Zhang L, Robinson RA, Weigel RJ. Extracellular matrix 1 (ECM1) expression is a novel prognostic marker for poor long-term survival in breast cancer: a hospital-based cohort study in Iowa. *Ann Surg Oncol*. 2009; 16: 2280-2287.
95. Chen H, Jia W, Li J. ECM1 promotes migration and invasion of hepatocellular carcinoma by inducing epithelial-mesenchymal transition. *World J Surg Oncol*. 2016; 14:195.
96. Krisenko MO, Cartagena A, Raman A, Geahlen RL. Nanomechanical property maps of breast cancer cells as determined by multiharmonic atomic force microscopy reveal Syk-dependent changes in microtubule stability mediated by MAP1B. *Biochemistry*. 2014; 54: 60-68.
97. Qian H-r, Yang Y. Functional role of autophagy in gastric cancer. *Oncotarget*. 2016; 7: 17641-17651.

98. Liu J, Yue P, Artym VV, Mueller SC, Guo W. The role of the exocyst in matrix metalloproteinase secretion and actin dynamics during tumor cell invadopodia formation. *Mol Biol Cell*. 2009; 20: 3763-3771.
99. Hoshino D, Kirkbride KC, Costello K, Clark ES, Sinha S, Grega-Larson N, Tyska MJ, Weaver AM. Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior. *Cell Rep*. 2013; 5: 1159-1168.
100. Yau C, Esserman L, Moore DH, Waldman F, Sninsky J, Benz CC. A multigene predictor of metastatic outcome in early stage hormone receptor-negative and triple-negative breast cancer. *Breast Canc Res*. 2010; 12: R85.
101. Ouderkerk JL, Krendel M. Non-muscle myosins in tumor progression, cancer cell invasion and metastasis. *Cytoskeleton*. 2014; 71: 447-463.
102. Blank U, Charles N, Benhamou M. The high-affinity immunoglobulin E receptor as pharmacological target. *Eur J Pharmacol*. 2016; 778: 24-32.
103. Baba Y, Doi K. MHC class II-related genes expression in porcine-serum-induced rat hepatic fibrosis. *Exp Mol Pathol*. 2004; 77: 214-221.
104. Mauldin IS, Wages NA, Stowman AM, Wang E, Smolkin ME, Olson WC, Deacon DH, Smith KT, Galeassi NV, Chianese-Bullock KA, Dengel LT, Marincola FM, et al. Intratumoral interferon-gamma increases chemokine production but fails to increase T cell infiltration of human melanoma metastases. *Cancer Immunol Immunother*. 2016; 65: 1189-1199.
105. Wågsäter D, Löfgren S, Hugander A, Dienus O, Dimberg J. Analysis of single nucleotide polymorphism in the promoter and protein expression of the chemokine Eotaxin-1 in colorectal cancer patients. *World J Surg Oncol*. 2007; 5: 84.
106. Loveridge CJ, Mui EJ, Patel R, Tan EH, Ahmad I, Welsh M, Galbraith J, Hedley A, Nixon C, Blyth K, Sansom O, Leung HY. Increased T cell infiltration elicited by *Erk5* deletion in a *Pten*-deficient mouse model of prostate carcinogenesis. *Cancer Res*. 2017; 77: 3158-3168.
107. van Damme J, Struyf S, Opdenakker G. Chemokine-protease interactions in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2004; 14: 201-208.
108. Fritz JM, Tennis MA, Orlicky DJ, Yin H, Ju C, Redente EF, Choo KS, Staab TA, Bouchard RJ, Merrick DT, Malkinson AM, Dwyer-Nield LD. Depletion of tumor-associated macrophages slows the growth of chemically induced mouse lung adenocarcinomas. *Front Immunol*. 2014; 5: 587.

109. Yoshimura T, Imamichi T, Weiss JM, Sato M, Li L, Matsukawa A, Wang JM. Induction of monocyte chemoattractant proteins in macrophages via the production of granulocyte / macrophage colony-stimulating factor by breast cancer cells. *Front Immunol*. 2016; 7: 2.
110. Bourguignon J, Borghi H, Sesboué R, Diarra-Mehrpour M, Bernaudin J-F, Métayer J, Martin J-P, Thiberville L. Immunohistochemical distribution of inter- α -trypsin inhibitor chains in normal and malignant human lung tissue. *J Histochem Cytochem*. 1999; 47: 1625-1632.
111. Gomez Toledo A, Nilsson J, Noborn F, Sihlbom C, Larson G. Positive mode LC-MS/MS analysis of chondroitin sulfate modified glycopeptides derived from light and heavy chains of the human inter- α -trypsin inhibitor complex. *Mol Cell Proteomics*. 2015; 14.12: 3118-3131.
112. Yang ZF, Ho DW, Lau CK, Lam CT, Lum CT, Poon RTP, Fan ST. Allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) is crucial for the survival and pro-inflammatory activity of macrophages. *Int Immunol*. 2005; 17: 1391-1397.
113. Yang P, An H, Liu X, Wen M, Zheng Y, Rui Y, Cao X. The cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1 mediates the production of type I interferon via a β -catenin-dependent pathway. *Nat Immunol*. 2010; 11: 487-495.
114. Madsen DH, Leonard D, Masedunskas A, Moyer A, Jürgensen HJ, Peters DE, Amornphimoltham P, Selvaraj A, Yamada SS, Brenner DA, Burgdorf S, Engelholm LH, et al. M2-like macrophages are responsible for collagen degradation through a mannose receptor-mediated pathway. *J Cell Biol*. 2013; 202: 951-966.
115. Zimmerman AG, Gu JJ, Laliberté J, Mitchell BS. Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase: regulation of expression and role in cellular proliferation and T lymphocyte activation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1998; 61: 181-209.
116. Veillette A, Latour S, Davidson D. Negative regulation of immunoreceptor signaling. *Annu Rev Immunol*. 2002; 20: 669-707.
117. Trusch F, Matena A, Vuk M, Koerver L, Knævelsrud H, Freemont PS, Meyer H, Bayer P. The N-terminal region of the ubiquitin regulatory X (UBX) domain-containing protein 1 (UBXD1) modulates interdomain communication within the valosin-containing protein p97. *J Biol Chem*. 2015; 290: 29414-29427.
118. Quémeneur L, Gerland L-M, Flacher M, Ffrench M, Revillard J-P, Genestier L. Differential control of cell cycle, proliferation, and survival of primary T lymphocytes by purine and pyrimidine nucleotides. *J Immunol*. 2003; 170: 4986-4995.

Article n°2 : Knockout of the C protein improves the oncolytic and immunotherapeutic properties of Measles Virus

Joëlle S. Nader, Tacien Petithomme, Chantal Combredet, Clarisse Panterne, Rana Chebbo, Jean-François Fonteneau, Daniel Pouliquen, Marc Grégoire, Frédéric Tangy, Nicolas Boisgerault

Les souches atténuées du virus de la rougeole (MV) sont naturellement oncolytiques contre une grande variété de cancers humains dont la sensibilité dépend de la surexpression du récepteur CD46 à la surface des cellules et d'anomalies dans la réponse interféron de type I (IFN I). Différentes modifications du MV ont déjà été testées pour améliorer sa spécificité pour les cellules cancéreuses. Dans cet article, nous avons émis l'hypothèse que la délétion de la protéine C pourrait avoir des effets positifs sur plusieurs aspects de son activité oncolytique : induction d'une mort cellulaire plus rapide, augmentation de la production de signaux de danger et renforcement de sa sécurité vis-à-vis des cellules non malignes. Pour cela nous avons comparé, *in vitro* et *in vivo*, sur

des lignées de mésothéliomes humains (MM), l'effet oncolytique de ce virus modifié MV-ΔC par rapport au virus parental MV.

Sur les 12 lignées testées, nous avons pu démontrer que 7 étaient autant voire plus sensibles à l'infection par le MV-ΔC que par le MV, alors que deux étaient résistantes au MV-ΔC mais pas au MV. Comme attendu, les 3 lignées précédemment décrite comme résistantes au MV étaient aussi résistantes au MV-ΔC. La mort cellulaire induite par MV-ΔC se traduit par l'augmentation de l'activation des caspases 3 et 7, par la production de signaux de dangers tels que HMGB1, ainsi que par une synthèse importante d'ARN double brin viraux. Ces propriétés oncolytiques améliorées ont été confirmées *in vivo* dans des modèles de souris immunodéficientes dans lesquels une seule injection du MV-ΔC était suffisante pour induire une régression plus rapide de xénogreffes péritonéales du MM par rapport au MV. Afin de tester si la mort cellulaire induite par ce virus modifié était immunogène, nous avons co-cultivé une des lignées de MM (Meso 13) infectées par le MV-ΔC ou MV avec des cellules dendritiques immatures dérivées de monocytes humains (iDCs). Les iDCs étaient activées dans les deux conditions mais cette maturation était plus prononcée avec le MV-ΔC.

En conclusion, cette étude nous a permis de confirmer notre hypothèse et de montrer que le virus modifié MV-ΔC à des propriétés oncolytiques plus avancées caractérisées par une mort cellulaire plus rapide, une production de plusieurs signaux de dangers et une activation des cellules immunitaires.

Knockout of the C protein improves the oncolytic and immunotherapeutic properties of Measles Virus

Joëlle S. Nader, Tacien Petithomme, Chantal Combredet, Clarisse Panterne, Rana Chebbo, Jean-François Fonteneau, Daniel Pouliquen, Marc Grégoire, Frédéric Tangy, Nicolas Boisgerault

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

² CNRS-UMR3569, Unité de Génomique Virale et Vaccination, Institut Pasteur, Paris, France

Live-attenuated strains of measles virus (MV) are naturally oncolytic against a wide variety of human cancers whose sensitivity depends on both the overexpression of CD46 and defects in the type I interferon (IFN) response pathway. We hypothesized that the knockout of the C protein from MV could have positive effects on several aspects of its oncolytic activity by inducing faster tumor cell death, increasing the production of danger signals of cellular and viral origin and by reinforcing its safety regarding non-malignant cells. When used *in vitro* against human malignant pleural mesothelioma (MPM) cells, MV-ΔC induced faster cell death than parental MV in previously shown MV-sensitive cells, despite a lower replication efficacy due to the absence of the C protein. These enhanced oncolytic properties were confirmed *in vivo* in immunodeficient mouse models in which a single injection of the virus was sufficient to control orthotopically-grown peritoneal MM xenografts. As we postulated, MV-ΔC-related infection and tumor cell death were associated with the synthesis of large quantities of viral dsRNA and an increased release of the danger signal HMGB1. MV-ΔC-infected MPM cells also promoted efficient maturation of human dendritic cells and we demonstrated that this activation depended on viral replication and involved activation the Protein Kinase RNA-activated (PKR) pathway. Our results show that a simple modification of Schwarz MV can strongly improve its oncolytic properties.

INTRODUCTION

With the recent approval of the herpesvirus Talimogene laherparepvec (T-vec) for the treatment of malignant melanoma in the USA and in Europe, and several other oncolytic viruses (OVs) currently evaluated in phase III clinical trials [1], OV research enters a new phase in which improvements of viruses to enhance clinical efficacy takes an important place. Unmodified live-attenuated strains of measles virus (MV) have been shown to naturally exert oncolytic activity against many types of cancers and are currently evaluated clinically for patients with ovarian cancer [2], multiple myeloma [3] and mesothelioma [4]. Modifications of oncolytic MV were first mainly concentrated on increasing safety, for example by inserting the gene of β -interferon into MV genome or by retargeting the virus toward alternative tumor-specific receptors, but extensive efforts are being made to improve its immunotherapeutic properties [5-7].

The MV genome carries 6 genes that encode 8 proteins; N, P, V, C, M, F, H and L. The two non-structural proteins, V and C, both encoded from the P gene, play a central role in controlling the induction of type I interferons (IFN) [8], the major arm of the antiviral innate immune response [9]. Earlier studies described how the measles virus C protein inhibits the type I IFN response by antagonizing the different activities of PKR [10, 11] and by shuttling between the cytoplasm and the nucleus to prevent the transcription of the IFN- β gene [12]. It also acts as a processivity factor for the viral RNA polymerase [13], modulating its engagement in transcription or replication, and controlling the formation of viral double-stranded RNA (dsRNA) that can be detected by cellular sensors such as the PKR [14]. The C protein exhibits another essential role in autophagy [15], an alternative pathway which delays apoptosis in infected cells and favors the production of higher titers of viral particles. This mechanism is also thought to help mitigating the innate immune response through destruction of mitochondria by a process called mitophagy [16, 17].

These different functions of the C protein make it an interesting target to modulate cell death and the innate immune response in order to improve the oncolytic properties of MV. As such, we hypothesized that knocking out the C protein could enhance the oncolytic activity of MV by bypassing autophagy and inducing faster cell death, and by increasing the amount of dsRNA in infected cells that can act as a danger signal to better activate the anti-tumor immune response compared to parental MV. We previously showed that the Schwarz attenuated strain of MV is able to infect and replicate in malignant pleural mesothelioma (MPM) cells and to subsequently induce immunogenic cell death that activates antigen-presenting cells [18-20]. In this study, we compared the efficacy of MV- Δ C to parental MV against twelve human MPM cell lines established in our

laboratory [21, 22]. We showed that MV-ΔC was able to infect and induce faster cell death than MV in previously shown MV-sensitive cells, both in vitro and in vivo in orthotopically-grown xenografts, but remained unable to spread in normal mesothelial cells. MV-ΔC-related tumor cell death was associated with the production of increased quantities of danger signals of cellular (HMGB1) and viral (dsRNA) origin that contributed to activate human dendritic cells (DC). When further investigating DC maturation, we demonstrated that the PKR pathway played a central role in this process, which suggests that dsRNA produced during MV-ΔC infection could improve the immunotherapeutic potential of oncolytic MV. MV-ΔC thus appears as a potent oncolytic virus that could be used against aggressive cancers for its enhanced direct cytotoxic properties but also for its improved immunotherapeutic potential.

MATERIALS & METHODS

Cell culture

Mesothelioma cell lines (Meso4, Meso11, Meso13, Meso34, Meso35, Meso47, Meso56, Meso76, Meso150, Meso163, Meso173 and Meso225) were established in our laboratory from pleural effusions collected by thoracocentesis of cancer patients after obtaining informed consent (Nantes Hospital, France). All cell lines were maintained in RPMI-1640 medium (Gibco-Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (PAA Laboratories, Les Mureaux, France), 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (all purchased from Gibco) and cultured at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Normal peritoneal mesothelial cells MES-F were purchased from Tebu-bio (Le Perray-en-Yvelines, France) and cultured in their specific medium according to the manufacturers' recommendations. Cells were routinely checked for Mycoplasma contamination using the Plasmotest™ from InvivoGen (Toulouse, France).

Virus production and infection

Live-attenuated Schwarz vaccine strain of measles virus (MV), the modified measles virus MV-ΔC (European patent EP 2759301 A1, 2013) and the viruses recombinant for the fluorescent proteins eGFP (MV-eGFP and MV-ΔC-eGFP) or mCherry (MV-mCherry and MV-ΔC-mCherry) were produced, purified and titered as previously described [23]. Infection of cells with the different viruses were performed at MOI = 1 unless indicated otherwise, and lasted 2 hours at 37°C. Viral inoculum was then replaced by fresh culture medium.

Infection was analyzed by time-lapse fluorescence microscopy. One day before infection, healthy cells and MPM cell lines were seeded in 24-well plates at a density of 1.5×10^5 cells per well. Cells were infected with MV-eGFP or MV-ΔC-eGFP (MOI = 1) and images were acquired every 10 minutes for 3 to 4 days with a Leica DMI6000B microscope using a 10X objective and the MetaMorph® Microscopy Automation & Image Analysis Software (version 7.8) at the MicroPiCell core facility (Nantes, France). Subsequent analyses were performed with the Fiji software [24].

Cell death analysis

Caspases-3/7 activation was measured in infected cells by either luminescence or fluorescence microscopy. For the luminescence assay, mesothelioma cells were seeded in a 96-well plate at a density of 15,000 cells per well and cultured for 24h. After 24h, cells were infected with either MV or MV-ΔC as described above. Caspases-3/7 activity was then quantified daily from day 2 to day 6 using the Caspase-Glo® 3/7 assay kit (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Briefly, 100 µl of Caspase-Glo® reagent was added onto the cells and incubated at room temperature for 1h. The luminescent signal of each sample was then measured during 1 second using a Mithras LB 940 luminometer (Berthold Technologies, Thoiry, France).

For the microscopy experiments, cells were seeded in a 96-well plate at a density of 50,000 cells per well. After 24h, cells were infected with either MV-mCherry or MV-ΔC-mCherry as described above. Viral inoculum was replaced by fresh culture medium mixed with NucView™ 405 caspase-3 substrate (Ozyme, Montigny-Le-Bretonneux, France). Images were acquired every day for 4 days with an Axio Observer Z1 microscope and the ZEN software (both from Carl Zeiss, Marly-le-Roi, France). Images were further analyzed with the Fiji Software.

Quantities of HMGB1 protein released from dying cells were measured by ELISA (IBL International, Hamburg, Germany) according to the manufacturer's instructions 72h after infection of 0.5×10^6 mesothelial or mesothelioma cells with MV or MV- Δ C (MOI = 1) in 6-well plates.

dsRNA immunofluorescence staining

One day before infection, MPM cells were seeded in μ -slides 8-well plates (ibidi, Martinsried, Germany) at a density of 40,000 cells per well. Cells were infected with either MV-eGFP or MV- Δ C-eGFP (MOI = 1). dsRNA staining was performed at 48h post-infection. Briefly, cells were fixed with PBS containing 4% paraformaldehyde (PFA, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) for 5 min, followed by PBS washes. Cells were then permeabilized with PBS containing 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Lyon, France) for 10 min. Plates were incubated with an anti-dsRNA antibody (clone J2, English & Scientific Consulting, Szirák, Hungary) diluted 1/1000 in PBS containing 0.1% Triton X-100 for 1h at room temperature, followed by 2 PBS washes. Cells were then incubated with an Alexa Fluor 647-coupled anti-mouse secondary antibody (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific) for 20 min at room temperature. The slides were then washed twice with PBS. Nuclei were stained with Hoechst (Thermo Fisher Scientific) for 5 min. Finally, cells were fixed for 20 min in PBS 4% PFA and then stored in PBS 0.5% PFA until analysis with a Nikon A1RS fluorescence confocal microscope (MicroPiCell core facility).

Real-time RT-qPCR

MPM cells were seeded in 6-well plates at a density of 0.5×10^6 cells per well and infected with MV or MV- Δ C at MOI = 1. Seventy-two hours after infection, total cell RNA was extracted using the Nucleospin® RNA II kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) and 0.5 μ g total RNA was reverse-transcribed using the MMLV reverse transcriptase (Invitrogen). PCR reactions were conducted using QuantiTect primer assays (Qiagen, Courtabœuf, France) for IFNA1 (coding for IFN- α), IFNB1 (IFN- β) and Mx1 (Mx1) and the Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Gene expression was expressed as relative expression compared to the expression of a housekeeping gene that encodes the human large ribosomal protein (RPLPO).

Monocyte-derived DC production and co-culture

Human PBMCs were obtained from platelet apheresis residues of healthy donors after informed consent (Etablissement Français du Sang, Nantes, France) under the agreement NTS-2014-06. After Ficoll density gradient centrifugation (Eurobio-AbCys, Courtabœuf, France), monocytes were purified from PBMCs by counterflow centrifugation elutriation using a Beckman Avanti J20 centrifuge equipped with a JE5.0 rotor and a 7 mL elutriation chamber (DTC core facility, CIC-BT-0503, Nantes, France). Monocyte purity (> 85%) was assessed by flow cytometry. Monocytes were differentiated into DCs in 6-well plates at 2×10^6 cells/mL in RPMI-1640 supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 2% (v/v) human albumin (Laboratoire Français de Fractionnement et de Biotechnologies, Les Ulis, France), 1,000 U/mL recombinant human GM-CSF and 200 U/mL recombinant human IL-4 (both from CellGenix, Paris, France). Immature DCs (iDC) were harvested at day 6 and cultured for 24h at 1×10^6 cells/mL in 24-well under different conditions. After 24h, DC maturation was assessed by flow cytometry (FACS Canto II, CytoCell core facility, Nantes, France) after double staining with a PE-conjugated anti-HLA-DR antibody (clone AC122, Miltenyi Biotec, Paris, France) and a BV421-conjugated anti-CD83 antibody (clone HB15e, BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France). The percentage of matured DCs was determined as CD83+ cells among all HLA-DR+ cells. All flow cytometry analyses were performed using the FlowJo software (version 7.6.5, FlowJo LLC, Ashland, OR, USA).

In vivo studies

Six-week old female NOD SCID mice were obtained from Charles River Laboratories (Larbresles, France). Mesothelioma xenograft models were established by challenging the mice intraperitoneally with 5×10^6 Meso34 or Meso163 cells. Three weeks or two months post-challenge for Meso163 and Meso34, respectively, mice were randomized into three groups and injected intraperitoneally with 100 µL of control saline (PBS), MV-eGFP (2×10^5 TCID₅₀) or MV-ΔC-eGFP (2×10^5 TCID₅₀). Fifteen days after treatment, animals were sacrificed and metastatic nodules or residual tumor tissues were collected and fixed in 4% paraformaldehyde

(Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA) for weighing and subsequent histochemical analysis.

Statistical analysis

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

MV-ΔC induces faster tumor cell death than parental MV

To determine whether MV-ΔC exhibited improved oncolytic properties compared to parental MV, we first infected healthy mesothelial cells and twelve human MPM cell lines, which were previously tested in our group [21], selected for their different levels of susceptibility to oncolytic MV. Cells were first infected with an MV-ΔC recombinant for eGFP and infection and cell death were evaluated by fluorescence microscopy (Figure 1 & Supplemental Figure 1). MPM cells previously shown to be resistant to parental MV, Meso4 (Figure 1), Meso173 and to a lesser extent Meso150 (Supplemental Figure 1), were also resistant to MV-ΔC. Interestingly, several MPM cell lines, Meso11, Meso13, Meso34, Meso163 (Figure 1), Meso47, Meso76 and Meso225 (Supplemental Figure 1), looked similarly or more sensitive to the oncolytic activity of MV-ΔC than of MV. However, levels of fluorescence were lower with MV-ΔC, suggesting lower viral titers, but this did not impair cell death induction as all these cell lines exhibited extended cell death after 72 hours. On the contrary, Meso35 and Meso56 seemed less sensitive to MV-ΔC

oncolytic activity than to parental MV. As expected, MES-F normal mesothelial cells were resistant to both MV and MV-ΔC infection, which confirmed specificity of our new oncolytic MV-ΔC for tumor cells.

To better evaluate cell death induced by MV-ΔC, we analyzed the activation of caspases-3/7 by fluorescence microscopy and a luminescence assay (Figure 2). We confirmed that MV-ΔC induces faster cell death with extensive activation of caspases-3/7 observed as soon as 48h after infection for Meso11 and Meso13 sensitive cells compared to 96h with parental MV (Figure 2A). Quantification of the caspases-3/7 activation over 6 days on all twelve human MPM cell lines (Figure 2B) confirmed that the three cell lines resistant to MV (Meso4, Meso150, Meso173) were also insensitive to MV-ΔC oncolytic activity. Meso11, Meso13 Meso76 and Meso225 showed enhanced oncolytic activity of MV-ΔC over MV with higher activation of caspases-3/7, whereas Meso34, Meso47 and Meso163 showed similar activation of caspases-3/7 between MV and MV-ΔC. We also confirmed that Meso35 and Meso56 seemed resistant to MV-ΔC but not to MV.

We hypothesized that this resistance of Meso35 and Meso56 to MV knocked out for the C protein was either due to the inability of the virus to inhibit the type I interferon response or to its capacity to induce cell death too rapidly, both of which could impair viral replication and spreading. When Meso35 cells were pre-incubated with the type I interferon pathway inhibitor Ruxolitinib before MV-ΔC infection, we did not observe any enhancement of viral spreading or cell death (data not shown). Similarly, we did not see any difference in the expression of IFN- α , IFN- β or Mx1 between MV and MV-ΔC infection, thus confirming that differences in sensitivity to MV-ΔC were not dependent on the status of the type I IFN response (Supplemental Figure 2). On the contrary, when Meso35 cells were pre-incubated with the pan-caspase inhibitor Z-VAD, we showed an enhancement of infection and virus spread over time compared to untreated MV-ΔC-infected cells (Figure 3).

To test whether MV-ΔC retained its oncolytic properties *in vivo*, we performed orthotopic xenograft experiments in NOD SCID mice. Of all seven MV-ΔC-sensitive human MPM cell lines, we were only able to grow Meso34 and Meso163 *in vivo* in the peritoneal cavity of these mice. For both cell lines, tumor masses two weeks after treatment were significantly decreased in mice treated by one dose of MV-ΔC compared to control animals (610 mg vs 310.5 mg and 300 mg vs 109 mg for Meso163 and Meso34, respectively) (Figure 4A). In both models, MV-ΔC was as least as good in decreasing tumor masses as parental MV. For Meso34, the number and size of tumors

on the peritoneum were reduced for MV-ΔC-treated animals and to a lesser extent for MV treatment (Figure 4B). Histochemical analysis revealed that tumor density was strongly decreased in animals treated with MV-ΔC compared to controls, but also compared to animals treated with parental MV (Figure 4C).

MV-ΔC exhibits enhanced immunogenic potential

Oncolytic viruses exert their anti-tumor properties both by killing directly malignant cells and by activating immune cells participating to anti-tumor responses. To determine if the new MV-ΔC was able to promote the production of immunogenic molecules upon infection, we analyzed the release of a cell-derived danger signal, HMGB1, and the production of viral double-stranded RNA (dsRNA) in infected cells (Figure 5). We first showed that infection by both MV and MV-ΔC provoked the release of HMGB1 into the extracellular environment upon induction of immunogenic tumor cell death (Figure 5A). Moreover, MV-ΔC, by inducing faster and stronger cell killing, caused higher release of this molecule by dying cells than parental MV. Regarding the viral components, we found that the knockout of the C protein from MV led to the production of high amounts of dsRNA in the cytoplasm of infected tumor cells (Figure 5B). These dsRNA were not observed in control cells or when cells were infected with the parental MV strain.

To validate the immunogenicity of the cell death induced by MV-ΔC, we incubated infected Meso13 MV-sensitive tumor cells with human monocyte-derived immature dendritic cells (iDC) from six healthy donors and analyzed their maturation by flow cytometry after 20h (Figure 6). As we previously showed [19], Meso13 cells infected by parental oncolytic MV activated iDC as shown by the increased expression of the maturation marker CD83 on the surface of these cells (23.2% of CD83⁺ cells vs 2.5% for iDC) (Figure 6B, left panel). Infection of Meso13 cells with MV-ΔC at the same MOI further enhanced activation of iDC (46.3% of CD83⁺ cells). As a negative control, Meso13 were induced into apoptosis by ultraviolet radiation, which is known to be non-immunogenic. Indeed, only 6.9% of iDC presented a mature phenotype when cultured with these cells. Similarly, only 2.9% of iDC were positive for CD83 at their surface when incubated with living Meso13.

As shown in Figure 5, infection of human MPM cells by MV and MV-ΔC induced cell death associated with the production of danger signals from both cellular (HMGB1) and viral (dsRNA)

origin. We hypothesized that the latter would be the key determinants for the maturation of iDC. As such, when iDC were incubated with MV or MV-ΔC at the same MOI of 0.2, we observed maturation of these cells (24.5% and 32.2%, respectively), thus suggesting that the viral components are the major inducers of DC maturation. To further investigate the involvement of both viruses in DC activation, we inactivated them by UV irradiation (UVi). This completely abrogated DC maturation with only 4.4% and 6.2% CD83⁺ cells for MV and MV-ΔC, respectively (Figure 6B, central panel), suggesting that viral replication was necessary for DC maturation.

DC can recognize exogenous RNA through different pathways: TLR3 can detect the presence of dsRNA in the endosomal pathway while MDA5, RIG-I or the PKR recognize them in the cytoplasm. Our preliminary experiments showed that blocking of the RIG-I/MDA5 pathway with the TBK1 inhibitor MRT67307 and of TLR3 with a competitive inhibitor of dsRNA or a TRIF inhibitor did not impair maturation induced by MV and MV-ΔC alone or after infection of tumor cells (data not shown). Similarly, inhibition of TLR7, which recognizes ssRNA, by IRS661 or pan-TLR blocking of the MyD88 signaling pathway did not show any effect on DC maturation, thus confirming that TLRs do not seem to be involved in our model (data not shown). Conversely, when we inhibited the PKR pathway with the specific inhibitor C16, we were able to mitigate DC maturation (Figure 6B, right panel). This inhibition was more important with MV-ΔC than with MV, as we expected based on the differences seen in dsRNA levels (Figure 5). When using MV-ΔC alone on iDC, the percentage of CD83⁺ cells decreased from 32.2% to 8.7% with C16. Similarly, we were able to reduce the maturation of iDC incubated with MV-ΔC-infected Meso13 cells, with the percentage of CD83⁺ DCs going from 46.3% to 8.7%.

DISCUSSION

OVs are novel immunotherapeutics with great potential for engineering and adaptation to different tumor situations. Among OVs, live-attenuated strains of MV display potent oncolytic properties and an unmatched safety profile due to their use for several decades for vaccination against measles. Despite its multiple natural anti-tumor properties, further modifications of this virus could enhance its potential, in particular the ability to efficiently activate tumor-specific immune responses that are currently sought for cancer therapy. In this study, we hypothesized that a simple

modification of its genome could enhance its ability to kill tumor cells and activate anti-tumor immune responses. As the C protein of MV plays different roles in controlling cell death induction and response of infected cells to viral replication, we postulated that knocking it out could enhance its oncolytic and immunotherapeutic potentials. Indeed, we demonstrated here that this modification increased cell death induction in several human MPM cell lines with higher activation of caspases-3/7. This enhanced oncolytic potential was also observed *in vivo* in orthotopic xenograft experiments. Moreover, cell death induced by MV-ΔC was characterized as more immunogenic with production of dsRNA during viral replication and increased release of the cellular danger signal HMGB1. This resulted in better maturation of human DCs exposed to MV-ΔC or MV-ΔC-infected tumor cells compared to parental MV. Furthermore, our inhibition experiments suggest that viral replication for MV-ΔC is necessary to efficiently activate DCs, and that the PKR pathway plays a central role in this activation.

Previous studies demonstrated that infection by a vaccine MV deficient for the C protein led to the production of large amounts of defective viral particles and accumulation of viral dsRNA due to the lack of processivity of the viral polymerase L in absence of the C protein [13, 14]. When considering oncolytic infection of tumor cells, this can be seen as a major drawback as these viral products are potent activators of the PKR that will trigger the innate immune response in these cells and ultimately limit MV replication. Here we showed that, in a majority of MPM cells that display deficiencies in their type I IFN response pathway [21], absence of the C protein was not detrimental to the oncolytic activity of MV-ΔC despite lower viral titers and the probable production of large numbers of defective viral particles. Moreover, when considering the immunotherapeutic activity of OV, production of defective viruses and of large amounts of viral dsRNA become an advantage that can be exploited to activate immune cells that can sense this type of danger signals. As such, by showing that human DCs can react to these viral signals, we confirmed that MV-ΔC displays enhanced immunogenicity compared to parental MV.

Immunogenic death is characterized by the release from dying cells of danger molecules that can be recognized by cells from the immune system [25]. When using oncolytic viruses, danger signals of cellular origin can be complemented by viral products that are potential activators of a multitude of PRRs in immune cells: for dsRNA alone, TLR3, RIG-I, MDA5 and the PKR are sensors that can trigger the activation of strong immune responses. In our study, we mainly focused on the role of these viral dsRNA molecules that were previously shown to be synthesized in large amounts in

cells infected by a CKO MV [13, 14]. Our first hypothesis was that DC would activate upon recognition of viral dsRNA through TLR3 in the endosomes after phagocytosis of fragments of dying cells. Surprisingly, we found that DC activation mainly took place through the cytoplasmic PKR pathway. Moreover, we demonstrated that the immunogenic potential of MV-ΔC seemed dependent on viral replication as inactivation of the virus by UV radiation abrogated DC maturation by this virus. Further experiments will be required to define exactly the different roles of defective viral particles, dsRNA molecules released from infected tumor cells and actual replication of MV-ΔC in these cells. We will also need to determine how to efficiently direct this immunogenicity toward tumor antigens while limiting at first responses directed against the virus. However, activation of the PKR in immune cell types that are commonly found in the tumor microenvironment could be a real therapeutic opportunity for oncolytic immunotherapy.

Another suggested important role for the MV C protein is its pro-autophagic function that is thought to delay apoptosis and thus prolong survival of infected cells [15]. Again, by inducing rapid cell death, MV-ΔC is at risk of producing low viral progeny that could jeopardize its oncolytic properties by limiting viral spread within tumors. In most tested cell lines, this was not the case as those were completely eradicated at a faster pace than with unmodified MV. This was confirmed *in vivo*, which suggests that viral spreading was similarly not altered enough to impair viral spread in a more complex environment. However, two of our cell lines seemed resistant to MV-ΔC due to this premature induction of cell death. Future studies will have to verify whether this decreased direct oncolytic activity could be complemented by a higher immunotherapeutic potential, as it was previously shown for another OV like the Vesicular Stomatitis Virus. This formal demonstration of the enhanced immunogenic potential of MV-ΔC will also depend on the use of relevant immunocompetent animal models that are still lacking for oncolytic MV research.

Our specific goal of engineering MV is part of a general strategy that involves the use of OVs to modulate on demand the tumor microenvironment. The immunotherapeutic potential of OVs is being confirmed by clinical results (ref) and we show here that, by playing on the type and kinetics of cell death induction, it is possible to improve it along with direct oncolytic properties of viruses. In a near future, OVs may become the most efficient therapeutics to disrupt the tumor microenvironment and fight tumor growth. OVs also appear like potent tools to thwart the immunosuppressive cues that reduce the efficacy of immunotherapies and other types of cancer treatments.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the MicroPiCell, DTC and CytoCell core facilities for their assistance. We also thank Sylvia Lambot for assisting with animal experiments.

This work was funded by grants from La Ligue Contre le Cancer, L'Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), La Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and l'Agence Nationale de la Recherche (ANR).

FIGURE LEGENDS

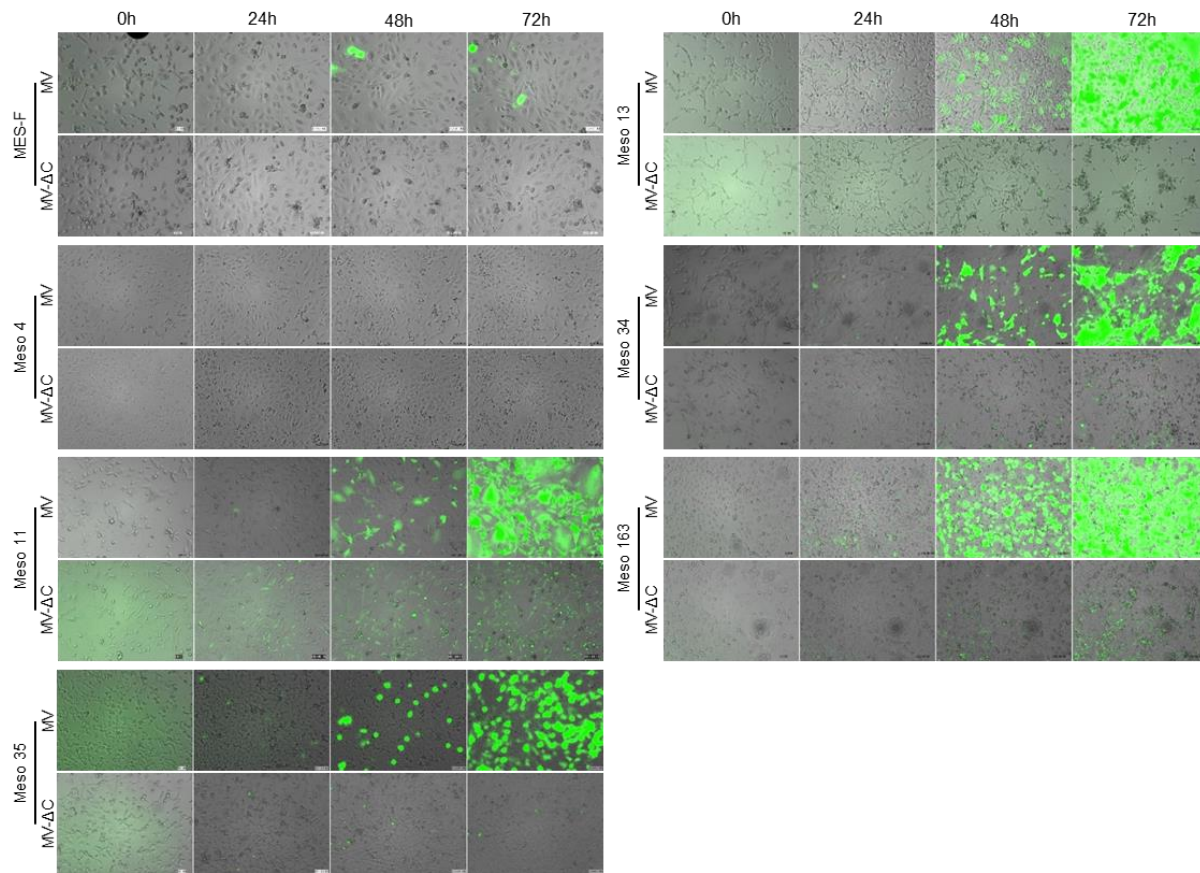


Figure 1. Oncolytic activity of MV-ΔC against human mesothelioma cells

Mesothelial (MES-F) and mesothelioma cells (Meso 4, Meso 11, Meso 13, Meso 34, Meso 35, Meso 163) were infected (MOI = 1) with MV-eGFP or MV-ΔC-eGFP and analyzed by time-lapse fluorescence microscopy for 72h. Images were created by merging both transmitted light and green fluorescence signals.

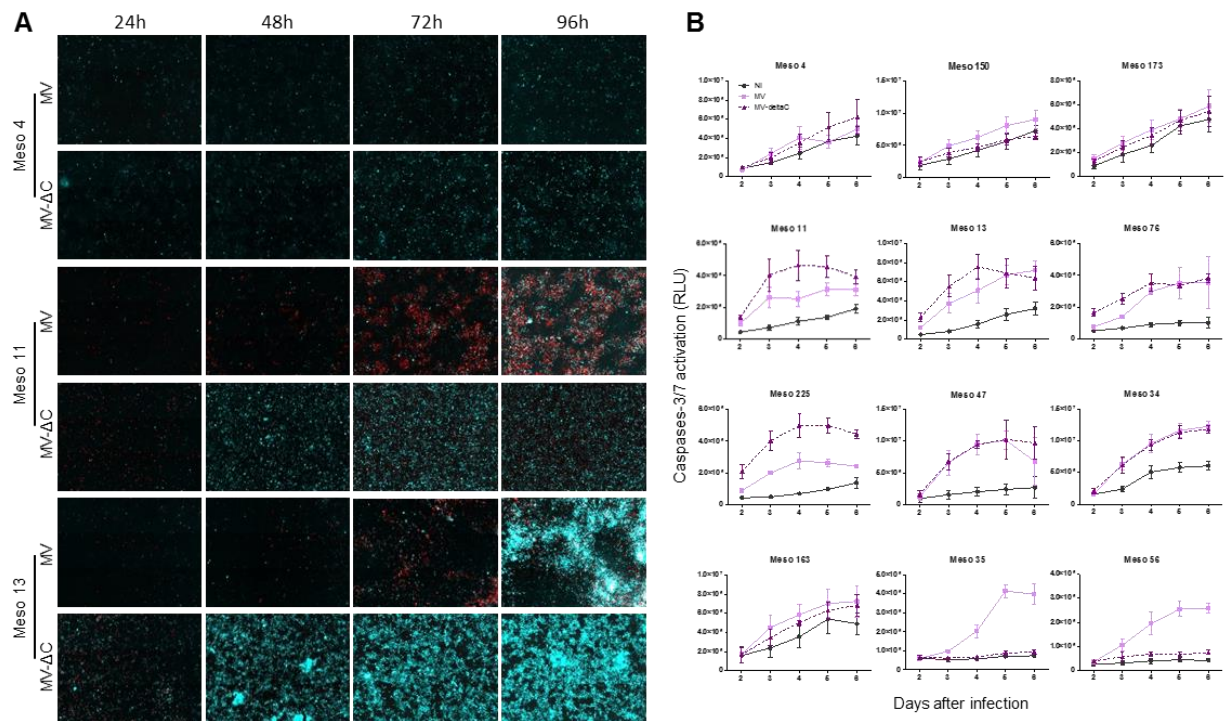


Figure 2. *MV-ΔC* is a potent inducer of tumor cell death

A) Mesothelioma cells Meso 4, Meso 11 and Meso 13 were infected (MOI = 1) with MV-mCherry or MV-ΔC-mCherry (red) and incubated with a fluorescent probe for detecting caspases-3/7 activation (cyan). Cells were then analyzed by fluorescence microscopy for 96h. B) Mesothelioma cells infected by MV or MV-ΔC (MOI = 1) were analyzed daily between days 2 and 6 after infection for caspases-3/7 activation using a bioluminescence assay. Data are presented as mean $\pm$ SEM of at least 3 independent experiments.

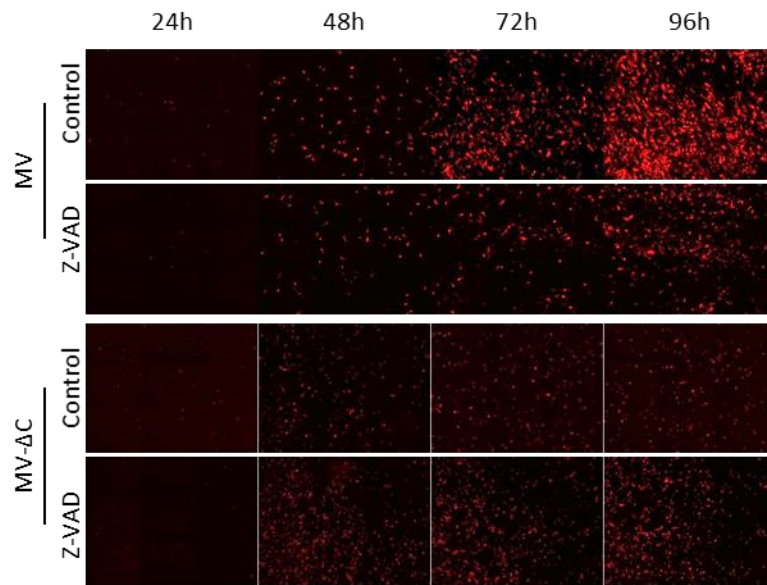


Figure 3. Enhancing MV- ΔC replication by inhibiting the caspase pathway

Meso 35 cells were infected (MOI = 1) with MV-mCherry or MV- ΔC -mCherry in presence or not of the pan-caspase inhibitor Z-VAD (20 μ M) were analyzed for 96h by fluorescence microscopy. Z-VAD was added every day until the experiment was over.

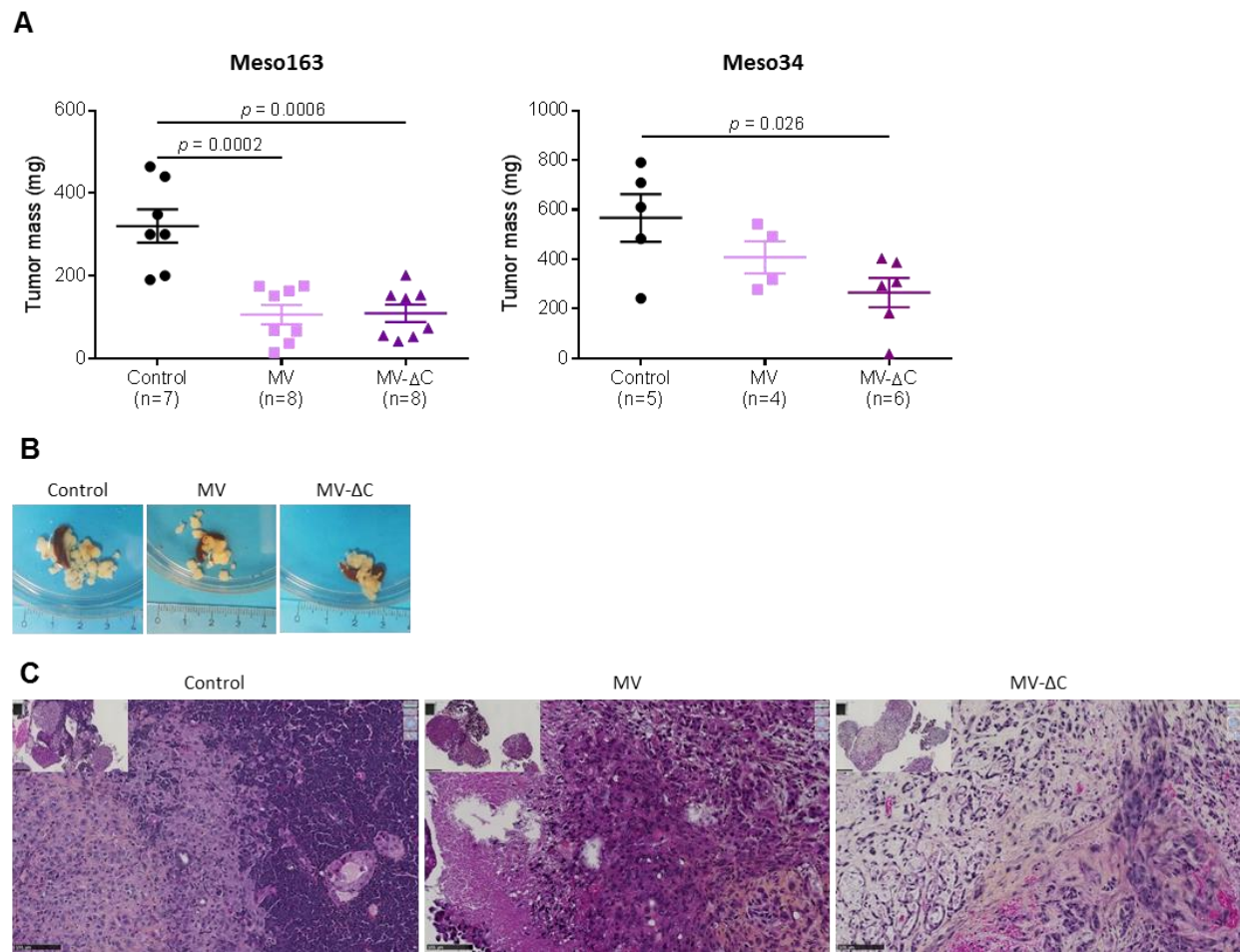


Figure 4. MV-ΔC exhibits oncolytic properties in vivo

A) NOD SCID mice were challenged with 5×10^6 Meso 163 or Meso 34 mesothelioma cells. Three weeks or two months, respectively, after tumor challenge, mice were injected intraperitoneally with MV, MV-ΔC (2×10^5 TCID₅₀) or control saline (PBS). Tumor masses were evaluated two weeks after treatment by weighing all tumors recovered from the peritoneal cavity. Data are presented as mean $\pm$ SEM. B) Pictures representative of the tumors recovered two weeks after treatment in control or virus-treated mice. C) Tumors recovered from mice were fixed and analyzed by histochemistry. Errors bars: 100 μ m.

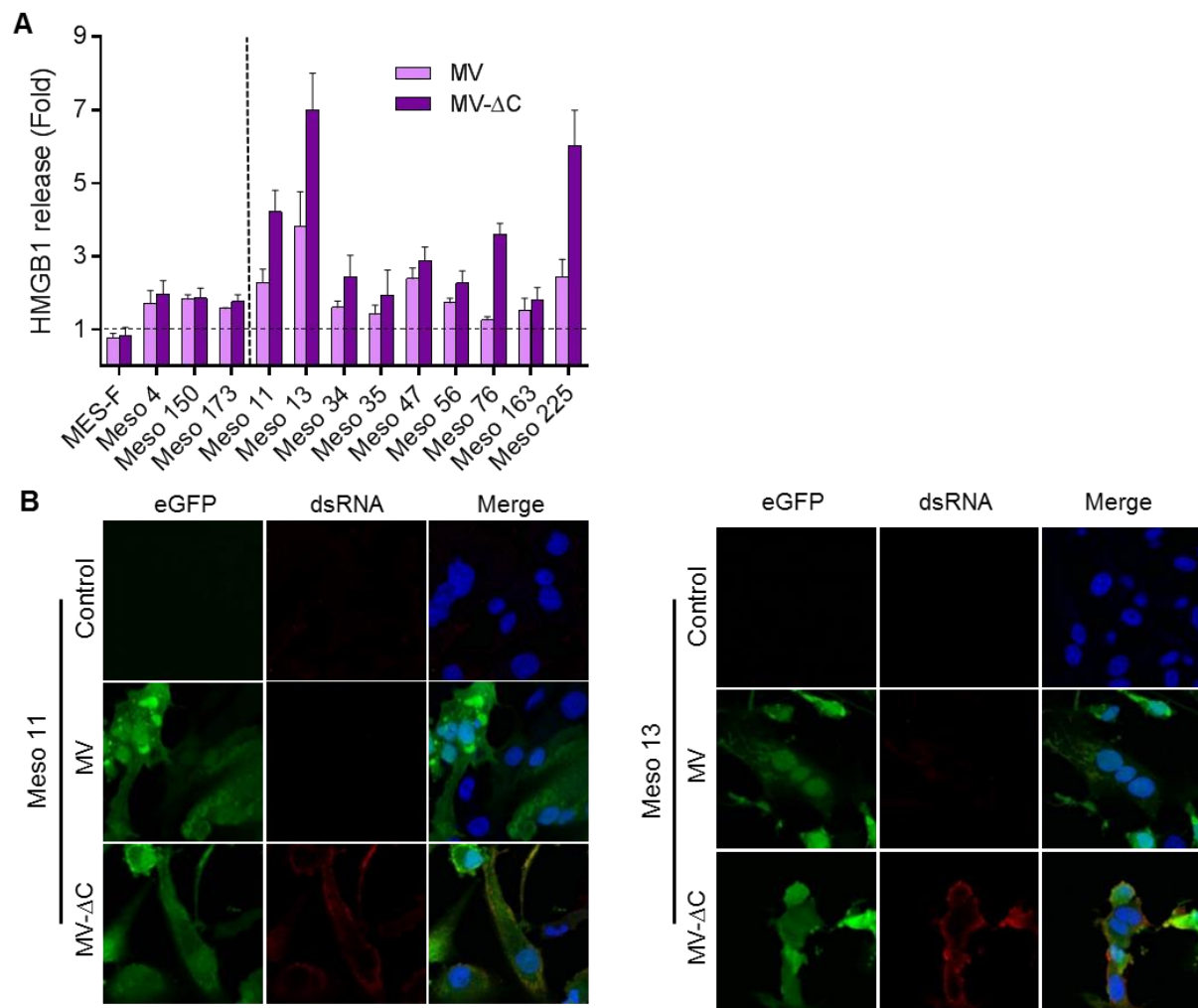


Figure 5. MV-ΔC infection produces cellular and viral danger signals

A) Mesothelial (MES-F) and mesothelioma cells infected for 3 days with MV or MV-ΔC (MOI = 1) were analyzed for release of HMGB1 by ELISA. Data were calculated as a ratio compared to non-infected cells and are presented as mean $\pm$ SEM of at least 3 independent experiments. B) Meso 11 and Meso 13 cells were infected or not for 48h with MV-eGFP or MV-ΔC-eGFP (MOI = 1) and analyzed by fluorescence microscopy after staining of the nuclei (DAPI, blue) and double-stranded RNA (red).

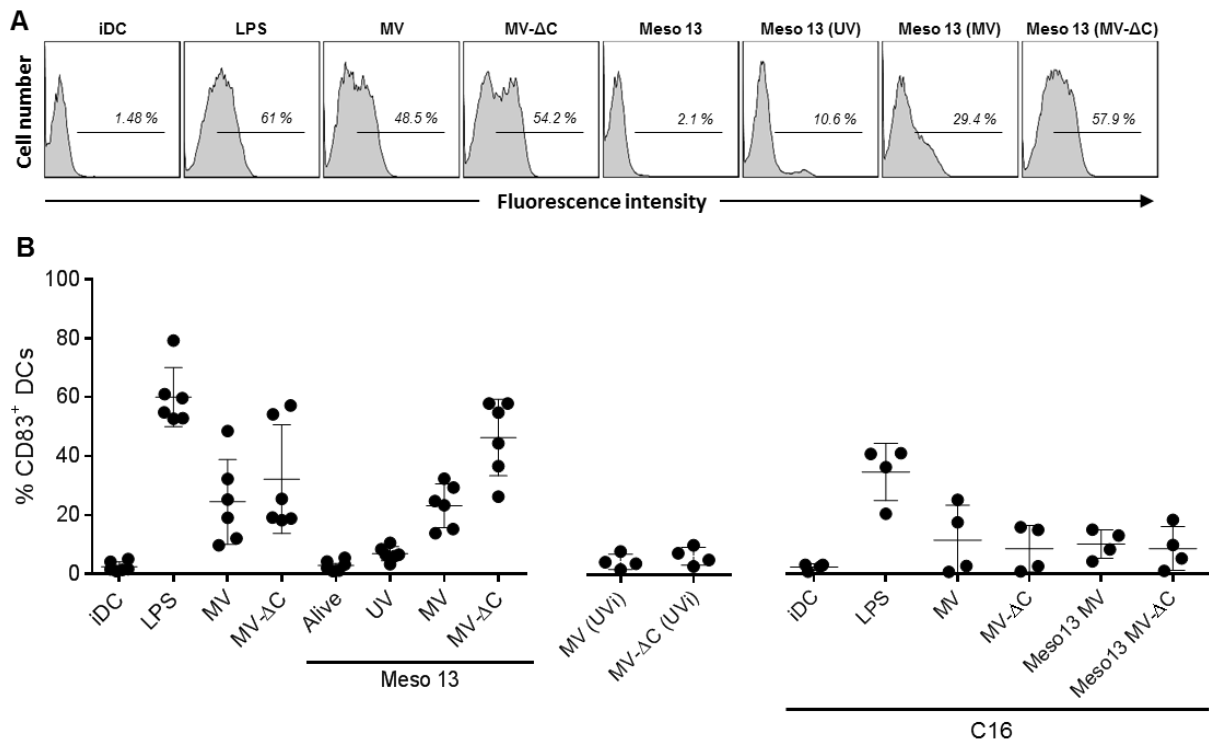
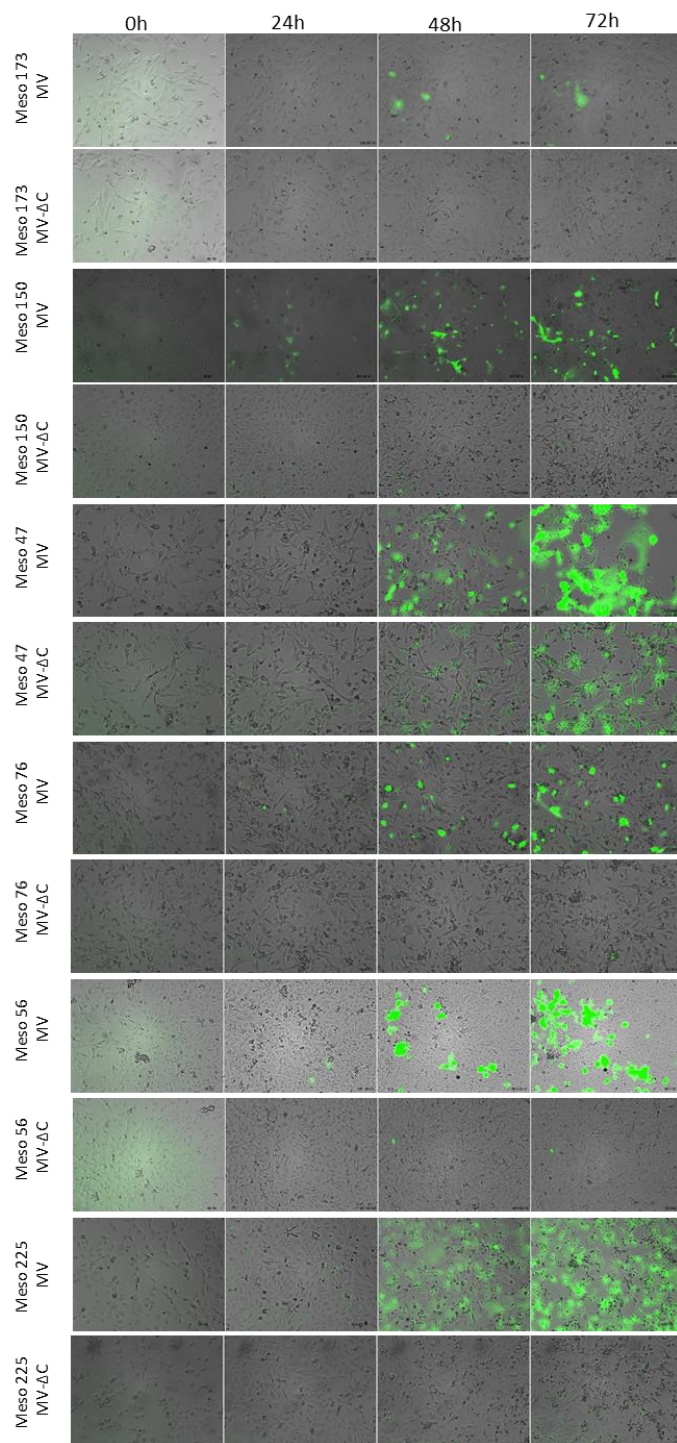


Figure 6. MV-ΔC infection induces maturation of human dendritic cells

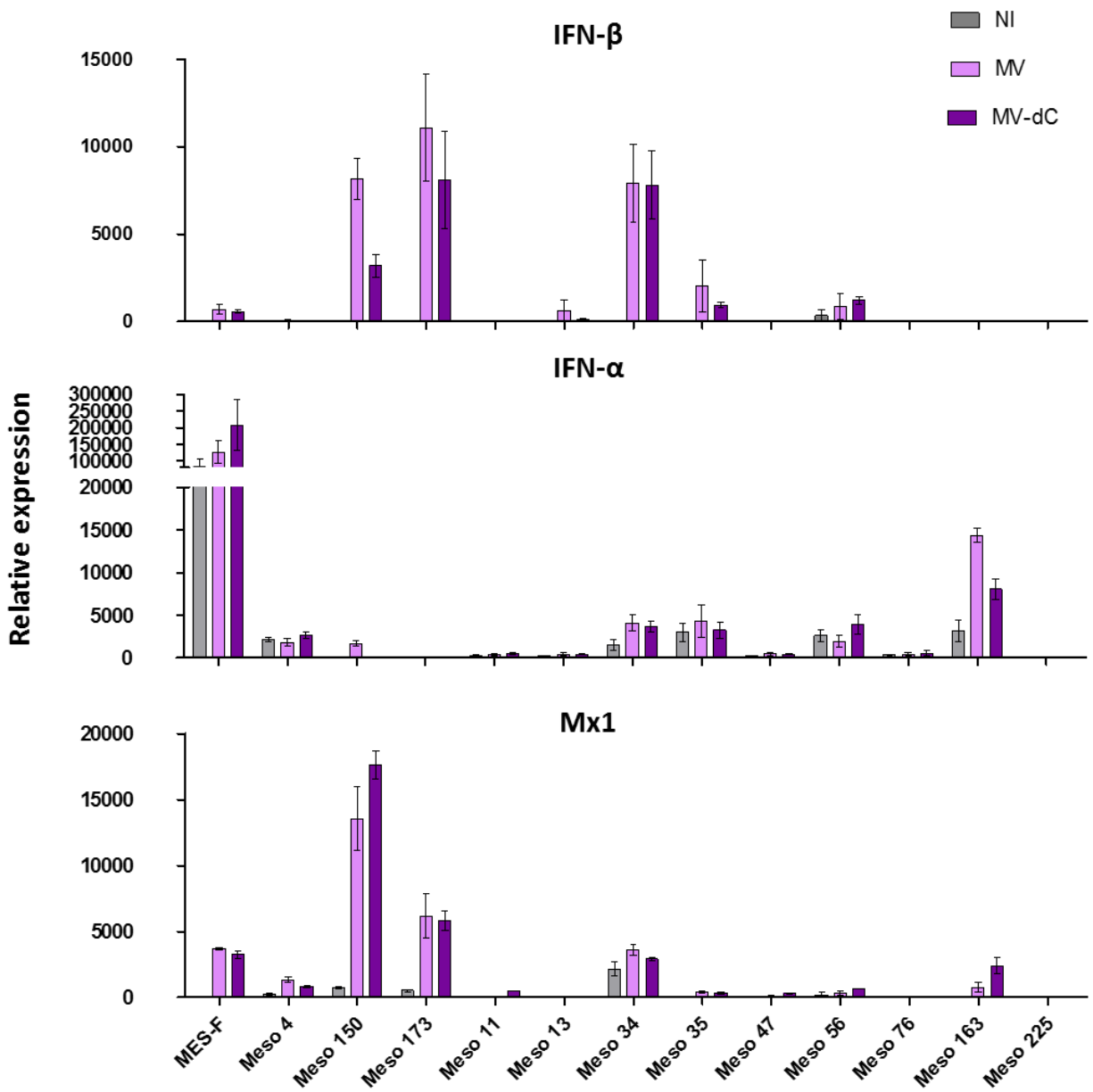
Immature monocyte-derived human dendritic cells (iDC) were co-cultured for 20h with LPS, MV, MV- ΔC (MOI = 0.2) or Meso 13 mesothelioma cells previously irradiated with UV, or infected with MV or MV- ΔC (MOI = 1), or left alive for 72h. iDC were also incubated with UV-inactivated (UVi) MV or MV- ΔC (MOI = 0.2). In some conditions, iDC were also co-incubated with the PKR inhibitor C16 (1 μM). DC were then stained for the CD83 maturation marker and analyzed by flow cytometry. (A) Data from a single healthy monocyte donor. B) Data pooled from six different healthy monocyte donors, presented as mean ± SEM.

LEGENDS TO SUPPLEMENTARY MATERIALS



Supplemental Figure S1.

Mesothelioma cells were infected (MOI = 1) with MV-eGFP or MV-ΔC-eGFP and analyzed by time-lapse fluorescence microscopy for 72h.



Supplemental Figure S2.

Mesothelial (MES-F) and mesothelioma cells were infected or not for 72h with MV or MV-ΔC. Expression of IFN-β, IFN-α and Mx1 was then analyzed by qRT-PCR on total RNA. Results were calculated using RPLPO as a reference gene and are presented as mean ± SEM of 3 independent experiments.

BIBLIOGRAPHY

1. Fukuhara, H, Ino, Y, and Todo, T (2016). Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer science* **107**: 1373-1379.
2. Galanis, E, Atherton, PJ, Maurer, MJ, Knutson, KL, Dowdy, SC, Cliby, WA, *et al.* (2015). Oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter to treat drug-resistant ovarian cancer. *Cancer research* **75**: 22-30.
3. Dispenzieri, A, Tong, C, LaPlant, B, Lacy, MQ, Laumann, K, Dingli, D, *et al.* (2017). Phase I trial of systemic administration of Edmonston strain of measles virus genetically engineered to express the sodium iodide symporter in patients with recurrent or refractory multiple myeloma. *Leukemia*.
4. Msaouel, P, Opyrchal, M, Dispenzieri, A, Peng, KW, Federspiel, MJ, Russell, SJ, *et al.* (2017). Clinical Trials with Oncolytic Measles Virus: Current Status and Future Prospects. *Current cancer drug targets*.
5. Aref, S, Bailey, K, and Fielding, A (2016). Measles to the Rescue: A Review of Oncolytic Measles Virus. *Viruses* **8**.
6. Engeland, CE, Grossardt, C, Veinalde, R, Bossow, S, Lutz, D, Kaufmann, JK, *et al.* (2014). CTLA-4 and PD-L1 checkpoint blockade enhances oncolytic measles virus therapy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **22**: 1949-1959.
7. Veinalde, R, Grossardt, C, Hartmann, L, Bourgeois-Daigneault, MC, Bell, JC, Jager, D, *et al.* (2017). Oncolytic measles virus encoding interleukin-12 mediates potent antitumor effects through T cell activation. *Oncoimmunology* **6**: e1285992.
8. Nakatsu, Y, Takeda, M, Ohno, S, Shirogane, Y, Iwasaki, M, and Yanagi, Y (2008). Measles virus circumvents the host interferon response by different actions of the C and V proteins. *Journal of virology* **82**: 8296-8306.
9. Ivashkiv, LB, and Donlin, LT (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nature reviews Immunology* **14**: 36-49.
10. McAllister, CS, Toth, AM, Zhang, P, Devaux, P, Cattaneo, R, and Samuel, CE (2010). Mechanisms of protein kinase PKR-mediated amplification of beta interferon induction by C protein-deficient measles virus. *Journal of virology* **84**: 380-386.
11. Toth, AM, Devaux, P, Cattaneo, R, and Samuel, CE (2009). Protein kinase PKR mediates the apoptosis induction and growth restriction phenotypes of C protein-deficient measles virus. *Journal of virology* **83**: 961-968.
12. Sparrer, KM, Pfaller, CK, and Conzelmann, KK (2012). Measles virus C protein interferes with Beta interferon transcription in the nucleus. *Journal of virology* **86**: 796-805.
13. Pfaller, CK, Mastorakos, GM, Matchett, WE, Ma, X, Samuel, CE, and Cattaneo, R (2015). Measles Virus Defective Interfering RNAs Are Generated Frequently and Early in the Absence of C Protein and Can Be Destabilized by Adenosine Deaminase Acting on RNA-1-Like Hypermutations. *Journal of virology* **89**: 7735-7747.
14. Pfaller, CK, Radeke, MJ, Cattaneo, R, and Samuel, CE (2014). Measles virus C protein impairs production of defective copyback double-stranded viral RNA and activation of protein kinase R. *Journal of virology* **88**: 456-468.
15. Richetta, C, Gregoire, IP, Verlhac, P, Azocar, O, Baguet, J, Flacher, M, *et al.* (2013). Sustained autophagy contributes to measles virus infectivity. *PLoS pathogens* **9**: e1003599.
16. Xia, M, Gonzalez, P, Li, C, Meng, G, Jiang, A, Wang, H, *et al.* (2014). Mitophagy enhances oncolytic measles virus replication by mitigating DDX58/RIG-I-like receptor signaling. *Journal of virology* **88**: 5152-5164.

17. Xia, M, Meng, G, Jiang, A, Chen, A, Dahlhaus, M, Gonzalez, P, *et al.* (2014). Mitophagy switches cell death from apoptosis to necrosis in NSCLC cells treated with oncolytic measles virus. *Oncotarget* **5**: 3907-3918.
18. Achard, C, Guillaume, JB, Bruni, D, Boisgerault, N, Combredet, C, Tangy, F, *et al.* (2017). Oncolytic measles virus induces tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated cytotoxicity by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Oncoimmunology* **6**: e1261240.
19. Gauvrit, A, Brandler, S, Sapede-Peroz, C, Boisgerault, N, Tangy, F, and Gregoire, M (2008). Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response. *Cancer research* **68**: 4882-4892.
20. Guillaume, JB, Boisgerault, N, Roulois, D, Menager, J, Combredet, C, Tangy, F, *et al.* (2013). Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**: 1147-1158.
21. Achard, C, Boisgerault, N, Delaunay, T, Roulois, D, Nedellec, S, Royer, PJ, *et al.* (2015). Sensitivity of human pleural mesothelioma to oncolytic measles virus depends on defects of the type I interferon response. *Oncotarget* **6**: 44892-44904.
22. Gueugnon, F, Leclercq, S, Blanquart, C, Sagan, C, Cellerin, L, Padieu, M, *et al.* (2011). Identification of novel markers for the diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *The American journal of pathology* **178**: 1033-1042.
23. Combredet, C, Labrousse, V, Mollet, L, Lorin, C, Delebecque, F, Hurtrel, B, *et al.* (2003). A molecularly cloned Schwarz strain of measles virus vaccine induces strong immune responses in macaques and transgenic mice. *Journal of virology* **77**: 11546-11554.
24. Schindelin, J, Arganda-Carreras, I, Frise, E, Kaynig, V, Longair, M, Pietzsch, T, *et al.* (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* **9**: 676-682.
25. Yatim, N, Cullen, S, and Albert, ML (2017). Dying cells actively regulate adaptive immune responses. *Nature reviews Immunology* **17**: 262-275.

Article n°3 : High oncolytic activity of a double deleted Vaccinia Virus Copenhagen strain against pleural mesothelioma

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

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

Le virus de la vaccine (VV) est un des virus oncolytiques les plus prometteurs. Ce virus a montré son efficacité dans plusieurs essais cliniques d'immunothérapie oncolytique contre différents types de cancers. Dans notre étude, nous avons utilisé un VV modifié avec une double délétion des gènes codant pour la thymidine kinase (TK) et la ribonucléotide réductase (RR) et exprimant la protéine GFP (VVT^K-RR⁻/GFP), afin d'évaluer son efficacité pour le traitement du mésothéliome humain (MM). Dans le but d'estimer la fraction de patients atteints de MM qui pourraient être sensibles à cette approche thérapeutique, nous avons étudié dans un premier temps, *in vitro*, la sensibilité de 22 lignées de MM à l'infection par le VVT^K-RR⁻/GFP et mesuré sa réplication dans 8 lignées. Nous avons pu démontrer que toutes les lignées étaient infectées et lysées par ce virus malgré des différences dans le niveau de réplication virale. Nous avons ensuite confirmé ces résultats par vidéo-microscopie, ce qui permet d'analyser l'infection et la mort des cellules tumorales grâce au suivi de la fluorescence émise par la GFP. Enfin, nous avons mis en évidence, par marquage de l'Annexine-V, l'induction d'apoptose dans toutes les lignées suite à l'exposition au virus.

Nous avons ensuite évalué *in vivo* l'efficacité du VVT^K-RR⁻/GFP dans des souris immunodéficientes NOD SCID transplantées, en intrapéritonéal, avec une lignée de MM humain (Meso 163). Le traitement des souris par une injection intrapéritonéale de VVT^K-RR⁻/GFP a entraîné une augmentation très nette et significative de la survie des souris en comparaison avec le groupe contrôle qui n'a reçu que du PBS. Nous avons alors disséqué les souris et observé un développement de métastases beaucoup moins important chez les souris traitées. Celles-ci ne présentaient pas plus de trois tumeurs en comparaison des souris contrôles envahies elles par de très nombreuses métastases.

En conclusion, nos résultats montrent que 100% des lignées de MM disponibles dans notre laboratoire sont sensibles à l'activité oncolytique du VVTK⁻RR⁻/GFP. De plus, le VVTK⁻RR⁻/GFP permet d'augmenter la survie de souris porteuses de tumeurs en limitant le nombre de métastases. Face au manque de traitements efficaces, ces résultats encourageants permettent d'envisager une approche d'immunothérapie oncolytique pour traiter les patients souffrant de mésothéliome.

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

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

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

² Labex IGO, Immunology Graft Oncology, Nantes, France

³Transgene, Illkirch, France.

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

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

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

Abstract

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

Introduction

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

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

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

Material and methods

Cell Culture

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

Vaccinia Virus VVTK-RR-/GFP

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

Video microscopy

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

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

MPM cell lines were seeded in 12-well plates at a density of 0.2×10⁶ cells/well in 2ml of culture medium containing VVTK-RR-/GFP at MOI of 0.01 or 0.1. After 24h of culture, cells were harvested for measurement of infection. For measurement of infection, cells were fixed with

phosphate saline buffer (PBS) containing 1% paraformaldehyde during 10min at room temperature and washed with PBS. GFP fluorescence was analyzed by flow cytometry on a FACS Calibur (BD Biosciences) and analyzed using the BD CellQuest™ Pro software.

Measurement of MPM cell death

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

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

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

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

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

Results and discussion

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

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

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

During the infection, the level of maximum fluorescence varied from one cell lines to another. For instance Meso225 and Meso173 failed to reach high level of fluorescence, whereas Meso13 and Meso34 reach high level of fluorescence (Figure 1B and supplemental videos 3, 4, 7 and 8). These experiments show that human MPM is highly sensitive to VVTK-RR-/GFP infection.

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

Then, we measured replication of VVTK-RR-/GFP in 8 MPM cell lines by PFU assay on 48h-culture supernatants. We were able to detect infectious particle in all supernatants (Figure 3A),

especially at the lowest MOI (0.01). Replication was low in three MPM cell lines (Meso11, 163 and 225), medium in three others (Meso13, 45 and 173) and high in the last two (Meso4 and 34). Replication was higher at the lowest MOI (0.01) since it allows more wave of infections than the highest MOI (0.1) (Figure 3B).

Altogether these results show that all human MPM cell lines are highly sensitive to the oncolytic activity of VVTK-RR-/GFP. In vitro, the virus is able to replicate and induces cell death that ends up into secondary necrosis. Only one study addressed the in vitro sensitivity of six human MPM cell lines to oncolytic VV and reported that all were sensitive (9). Herein, we show that 22 out of 22 human MPM cell lines are sensitive. This result suggests that antiviral type I interferon (IFN I) response seems to fail to protect tumor cells from VVTK-RR-/GFP replication. Indeed, we recently showed on the same 22 human MPM cell lines that 15 exhibit defects in the IFN I response that makes them sensitive to oncolytic MV virus (10). Seven MPM cell lines were able to control MV replication by a functional IFN I response. Among these 7 MPM cell lines, we showed that Meso4, 45 and 173 are not able to control VVTK-RR-/GFP replication. Thus, either VVTK-RR-/GFP replication is not sensitive to the type I IFN response due to virulence factor such as B18R that are able to block the type I IFN response (11), or there is a failure to detect the VVTK-RR-/GFP in these cell lines.

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

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

Mice were dissected to evaluate the tumor burden (Figure 4B). Mice that received PBS exhibit numerous metastasis on the abdominal muscular layer, the omentum, the mesentery, the stomach, the peritoneum and the diaphragm. In VVTK-RR-/GFP treated animals, we observed not more

than three massive tumors that often develop in the omentum and/or near the sternum in all animals. These results suggest that VVTK-RR-/GFP succeed to eradicate a lot of metastasis, but failed to control a very small number of tumors that may be the primary tumors. The failure of VVTK-RR-/GFP to totally cure these mice may be due to the absence of an adaptive immune system that should enhance the oncolytic efficacy by the induction of an antitumor immune response. Indeed, it has been shown that oncolytic VV induce an immunogenic cell death that allows antigen presenting cells to prime naïve T cell to develop an antitumor immune response (4, 12). We also reported recently that VVTK-RR-/GFP can increase effector cytotoxic CD4⁺ T cell activation by increasing the HLA class II tumor antigen presentation by tumor cells (Delaunay T, Oncoimmunology, in revision). One way to increase efficacy of this double deleted VV is to arm this virus with a suicide gene encoding an enzyme that transforms a prodrug into a drug such as the gene FCU1 (7).

Conclusion

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

Acknowledgements

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

FIGURE LEGENDS

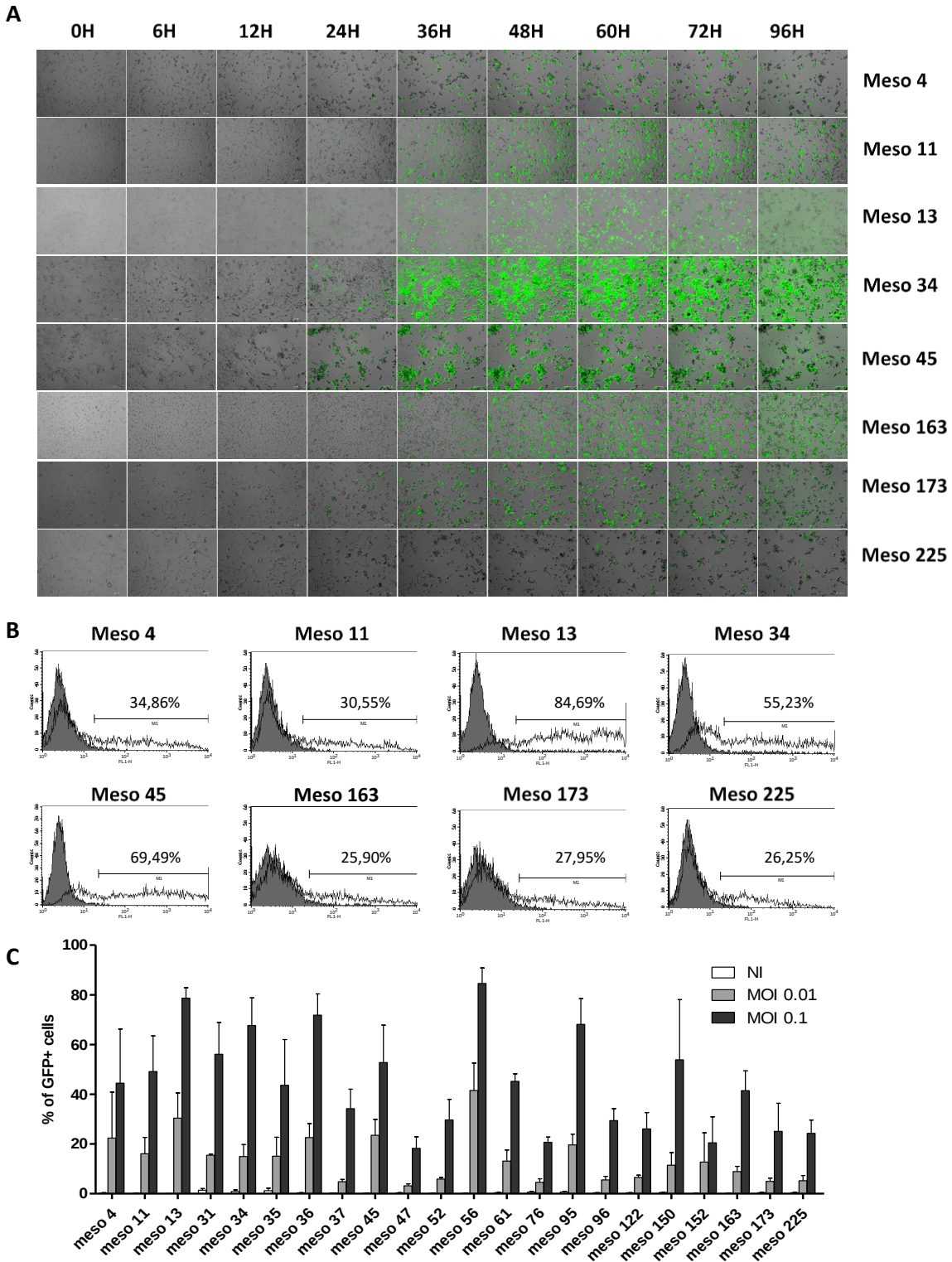


Figure 1: human MPM cell lines are sensitive to VVTK-RR-/GFP infection. (A) Meso4, 11, 13, 34, 45, 163, 173 and 225 human MPM cell lines were cultured with VVTK-RR-/GFP at MOI of 0.1 during 96h. Pictures were taken at 0h, 6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h and 96h. (B) Meso4,

11, 13, 34, 45, 163, 173 and 225 human MPM cell lines were cultured alone or with VVTK-RR-/GFP at an MOI of 0.01 or 0.1 during 24h. GFP fluorescence was analyzed by flow cytometry. (C) 22 human MPM cell lines were cultured with VVTK-RR-/GFP at MOI of 0.01 and 0.1 during 24h. GFP fluorescence was analyzed by flow cytometry. Histogram represents means $\pm$ SEM of three independent experiments.

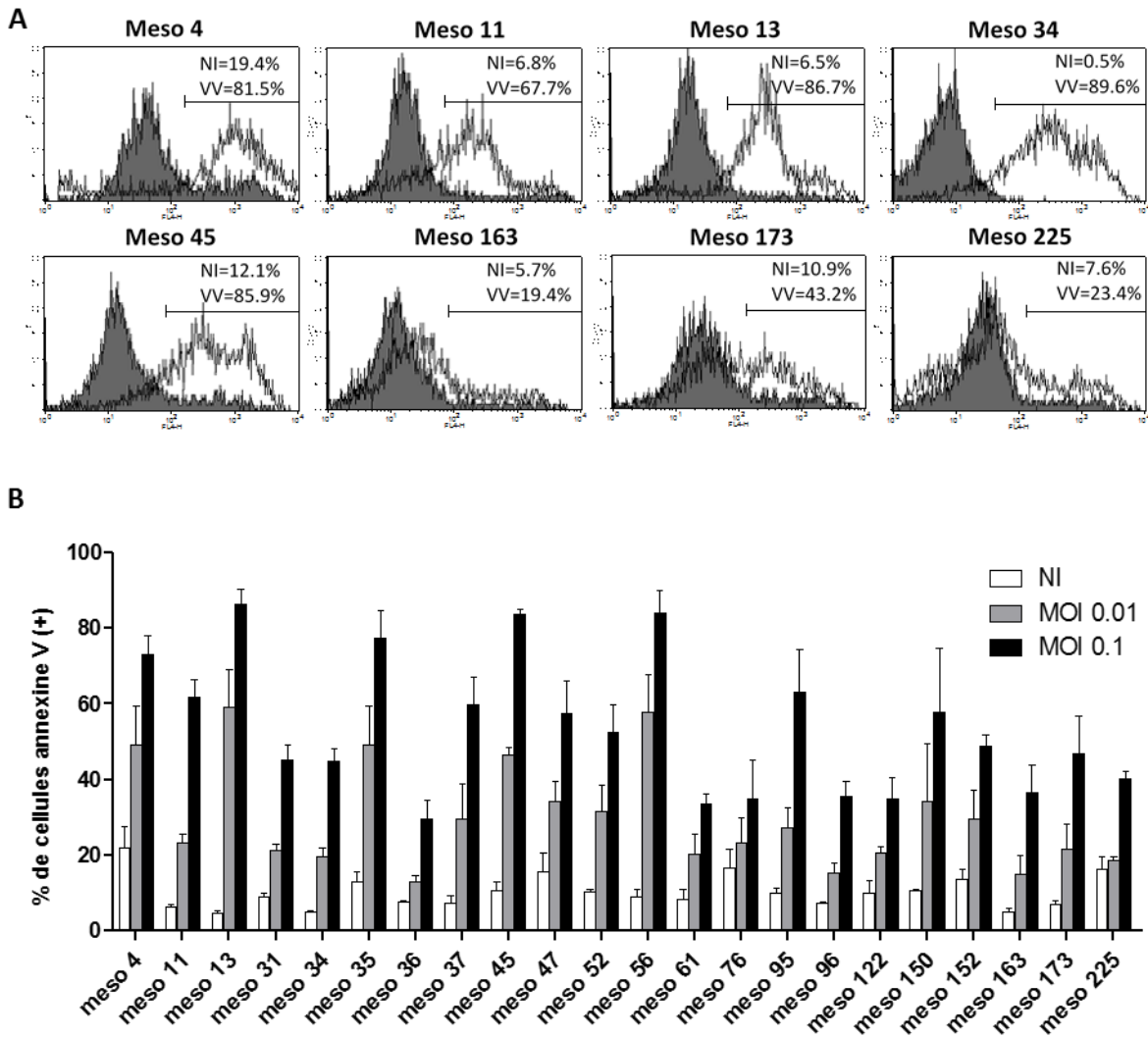


Figure 2: human MPM cell lines are sensitive to VVTK-RR-/GFP oncolytic activity. (A) Meso4, 11, 13, 34, 45, 163, 173 and 225 human MPM cell lines were cultured alone or with VVTK-RR-/GFP at MOI of 0.1 during 48h. Cells were labeled with annexin V-APC and propidium iodide. Annexin V-APC fluorescence was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

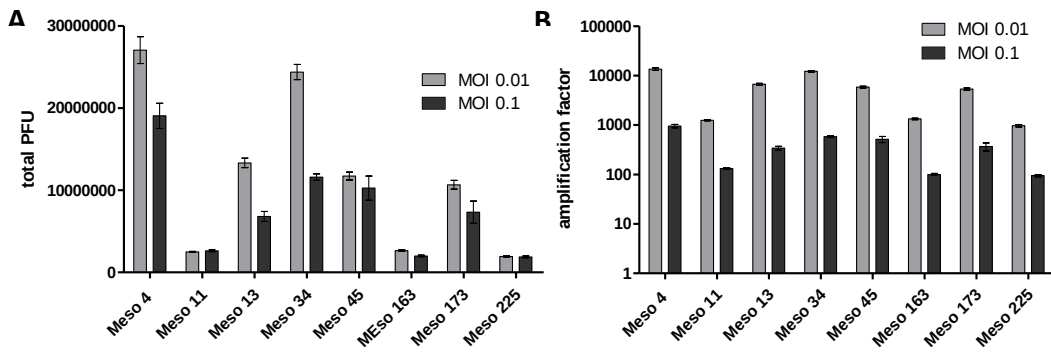


Figure 3: human MPM cell lines are permissive to VVTK-RR-/GFP infection. Meso4, 11, 13, 34, 45, 163, 173 and 225 human MPM cell lines were cultured with VVTK-RR-/GFP at MOI of 0.1 during 48h. Culture supernatants were then collected and presence of VVTK-RR-/GFP infectious particle was measured by PFU assay. (A) Histogram represents the PFU found in the supernatants. (B) Histogram represents the amplification factor determined by dividing the PFU found in the supernatants by the PFU used at the start of the experiments.

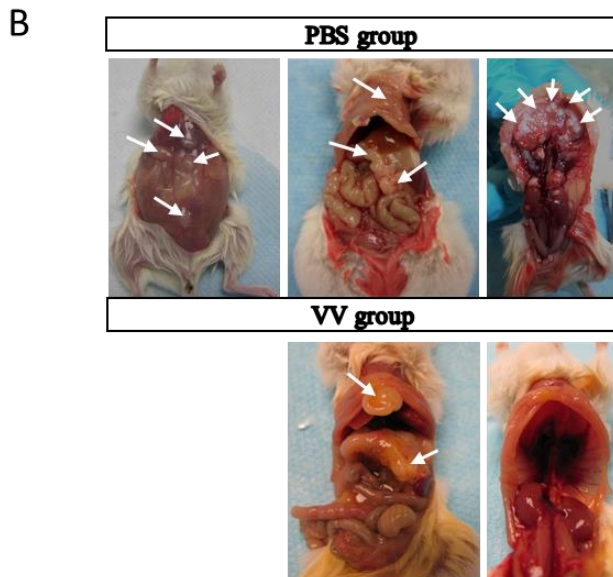
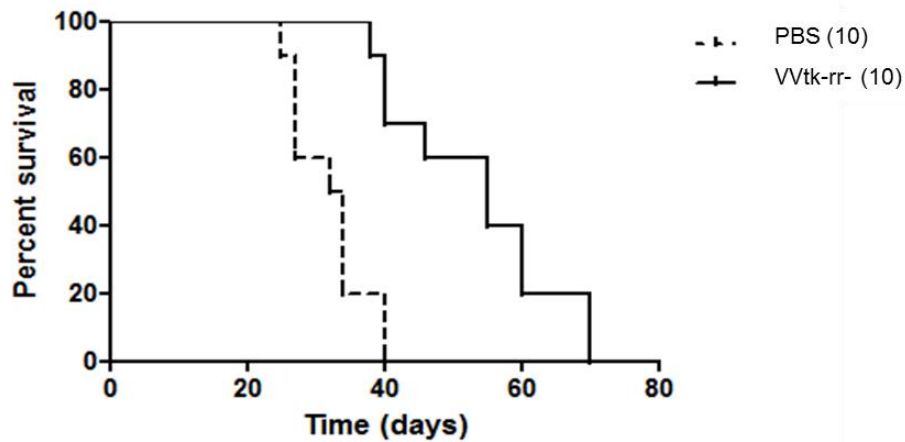


Figure 4: one intraperitoneal injection of VVTK-RR-/GFP increases survival of NOD scid mice engrafted with the human MPM cell line Meso163 and decreases tumors formations. NOD scid mice were challenged intraperitoneally with $5 \cdot 10^6$ Meso163 human MPM cells. After 3 weeks, at day 0, PBS or VVTK-RR-/GFP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

References

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

2009;83(4):1563-71. doi: 10.1128/JVI.01617-08. PubMed PMID: 19073732; PubMed Central PMCID: PMC2643777.

12. Fend L, Yamazaki T, Remy C, Fahrner C, Gantzer M, Nourtier V, et al. Immune Checkpoint Blockade, Immunogenic Chemotherapy or IFN-alpha Blockade Boost the Local and Abscopal Effects of Oncolytic Virotherapy. *Cancer research*. 2017;77(15):4146-57. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2165. PubMed PMID: 28536278.

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

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

DISCUSSION

Au cours de ma thèse, j'ai étudié le développement de nouveaux modèles précliniques pour le mésothéliome malin (MM) et la possibilité de traiter ce cancer avec différents virus oncolytiques. J'ai pu 1) caractériser 4 modèles de MM de rats immunocompétents différant entre eux par leurs degrés d'invasivités et montrer que le profil d'agressivité était associé à des modifications quantitatives de nombreuses protéines et à un infiltrat immunitaire décroissant. 2) Démontrer que l'utilisation d'un virus oncolytique modifié issu de la souche atténuée de la rougeole (MV-ΔC) est capable d'induire une mort plus rapide de lignées de MPM humains que le virus parental (MV). Cette mort est associée *in vitro* à une activation des cellules dendritiques et *in vivo*, dans un modèle de xénogreffe de MM humains chez des souris immunodéficientes, à une diminution de la masse tumorale. 3) Montrer que les MPM humains sont très sensibles à l'activité oncolytique du virus de la vaccine VVTK-RR⁻ *in vitro* et que, dans le modèle de xénogreffe de MM humains chez les souris immunodéficientes, ce virus permet d'allonger considérablement la survie des souris et de limiter le nombre de métastases.

Le MM est un cancer très agressif qui se développe à partir des cellules mésothéliales des différentes séreuses de l'organisme (plèvre, péritoine, péricarde et tunica vaginalis), principalement suite à une exposition prolongée aux fibres d'amiantes dans un cadre professionnel mais aussi environnemental [8]. Ce cancer se caractérise par une période de latence très longue, qui varie entre 20 à 40 ans, et un manque de symptômes propres, ce qui fait du MM un cancer très redoutable avec un diagnostic très tardif et un pronostic très défavorable. Etant considéré comme rare, le MM est relativement peu étudié, malgré une incidence en augmentation. Aucun progrès sensible n'a ainsi été obtenu pour son traitement au cours de la dernière décennie [330] depuis l'émergence de l'association cisplatine / pemetrexed en 2003 [77]. Face à cette situation critique, il est indispensable de créer et d'utiliser de nouveaux modèles précliniques afin de mieux comprendre la complexité et la diversité biologique de ce cancer et d'évaluer de nouvelles approches thérapeutiques.

La forte ressemblance entre le MM humain et ceux décrits dans les modèles animaux en terme de morphologie, d'apparence clinique et de progression tumorale montre une conservation des caractéristiques de la maladie entre les espèces [311], ce qui rend les modèles animaux très pertinents pour investiguer la tumorigenèse de ce cancer. Parmi les modèles développés, nous distinguons les modèles de xénogreffes de MM humains et les modèles immunocompétents induits

par l'exposition de l'animal aux fibres d'amiante ou basés sur l'injection orthotopique de lignées syngéniques. Ce dernier est celui qui imite le plus le MM humain. En effet, Mezzapelle *et al.* ont montré que l'injection orthotopique de la lignée murine AB dans des souris BALB/c induit le développement de tumeurs identiques aux MM humain des points de vue morphologique et histologique mais aussi au niveau de la réponse aux traitements [126]. Développé chez les souris C57BL/6 avec la lignée AK7, un autre modèle a servi à démontrer d'autres mécanismes dont l'activation des cellules T cytotoxiques CD8⁺ suite à un traitement par une combinaison de drogues épigénétiques [116]. Bien que ces modèles de souris immunocompétentes soient largement utilisés pour l'étude du MM et l'évaluation de nouveaux traitements, l'utilisation de modèles de rat (Fisher 344) offre une alternative intéressante puisqu'ils peuvent développer naturellement, à un âge avancé, des MM [131]. De plus, le rat présente une orthologie très proche de l'homme, des marqueurs de cellules immunitaires communs [130] et sa grande taille permet la récupération d'un nombre plus important d'échantillons sur un même individu par rapport à la souris.

Partant de ce principe, et dans le but d'appréhender la complexité de la biologie du MM, notamment sa capacité à se diviser en plusieurs sous-types, notre équipe a établi quatre modèles MM de rat F344 basés sur la transplantation de quatre lignées tumorales syngéniques différant par leur degré d'invasivité [332]. Mon premier objectif de thèse était donc de caractériser la spécificité de chaque modèle en collectant des données sur les interactions entre les composants du microenvironnement tumoral et les cellules tumorales, et de comprendre le rôle que jouent les infiltrats immunitaires dans le contexte de ce cancer. Pour cela nous avons réalisé une analyse protéomique associée à des analyses histologiques et d'expression de différentes cytokines et chimiokines. L'étude protéomique est basée sur l'utilisation de la technique SWATH/MS, une évolution récente de la spectrométrie de masse permettant d'effectuer des quantifications à partir de coupes en paraffine de tumeur fixées. En moyenne, 1300 protéines ont été détectées et identifiées pour chaque tumeur, ce qui a mené à trois listes de protéines d'intérêt, établies à partir de la comparaison de chaque tumeur invasive (F4-T2, 2, F5-T1 et M5- T1) avec la tumeur non invasive (M5-T2). Les changements quantitatifs dans un ensemble de protéines ont permis de souligner plusieurs événements clés liés à l'acquisition des propriétés invasives par les cellules de mésothéliome.

Nous avons ainsi distingué une augmentation de l'expression de protéines jouant un rôle essentiel dans la prolifération, le métabolisme et la transcription. Parmi ces protéines, le

changement le plus important partagé par les 3 MM invasifs concernait la galectine-3, une protéine multifonctionnelle distribuée à la fois dans le cytoplasme et dans le stroma de la tumeur. Elle est impliquée dans le développement, la progression, l'invasion et la production de métastases pour de nombreux cancers [333]. Bien que ce résultat soit opposé au résultat obtenu dans notre équipe sur des effusions pleurales prélevées chez des patients, où la galectine-3 était un marqueur de différenciation pour l'adénocarcinome pulmonaire [34], il n'est pas contradictoire car la situation dans les tumeurs (ne comprenant que 6,6 % de sous-types sarcomatoïdes dans cette étude) n'était pas connue. Il peut aussi être expliqué par le fait que les tumeurs de MM de rat dans notre étude, incluant toutes les composantes du microenvironnement tumoral, présentent toutes un profil sarcomatoïde. En effet, ce sous-type n'exprime même plus la mésothéline, le marqueur initial du MM [141]. Quant aux protéines diminuées, elles jouaient notamment un rôle dans la régulation du stress oxydatif, l'adhésion cellulaire, l'organisation de la membrane cellulaire et le cytosquelette.

In vivo, les deux lignées F5-T1 et M5-T1 se distinguent de la lignée F4-T2 par leur potentiel métastatique. Partant de ce constat, nous nous sommes intéressés aux protéines communes à ces deux lignées plus agressives. Comme attendu, plusieurs catégories de protéines ont été identifiées. Curieusement, l'abondance relative des deux protéines du cytosquelette, K2C8 et TBCA, augmente avec l'aggravation des propriétés invasives. La perte des protéines impliquées dans le trafic intracellulaire semble être particulièrement importante dans l'acquisition du profil invasif, où une diminution de l'expression d'un certain nombre de ces protéines a été observée dans F5-T1 et M5-T1. Concernant le stress oxydatif, la sous-expression de la sous-unité de l'hémoglobine α -1/2 suggère que ces deux types de tumeurs invasives présentent un taux d'hypoxie beaucoup plus élevé par rapport à la tumeur F4-T2.

Tous nos résultats ont tendance à montrer que le modèle le plus agressif des trois MM invasifs est M5-T1. Cette lignée cellulaire tumorale a montré la plus grande capacité invasive *in vitro* [142], alors qu'une infiltration maximale des organes abdominaux et la présence de métastases intra-parenchymales et nodales ont été observées *in vivo* dans le cadre de mon travail. Au niveau de l'analyse protéomique quantitative, M5-T1 se caractérise surtout par des changements importants concernant plusieurs protéines transmembranaires et des composants de la matrice extracellulaire [334-340].

Un marquage immunohistologique des macrophages et des lymphocytes T, et des analyses de l'expression de différentes cytokines et chimiokines nous ont permis d'associer l'agressivité de

la lignée M5-T1 à un profil immunosuppresseur. En effet cette lignée se caractérise par le plus faible infiltrat de cellules T et de macrophages corrélant avec la plus basse expression des molécules chimio-attractantes CXCL10, CCL5, CCL2 et CCL11. Ces résultats sont aussi cohérents avec la régulation négative de plusieurs protéines impliquées dans la présentation des antigènes du CMH de classe I, un élément crucial pour l'activation des lymphocytes T.

Contrairement à M5-T1, F4-T2 et F5-T1 partagent en commun des niveaux d'expression plus élevée de certaines chimiokines et cytokines (CCL2, CCL5, CCL7, CCL11, TNF- α), des protéines du CMH de classe II et des protéines impliqués dans la présentation des antigènes du CMH de classe I. Ces données sont cohérentes avec les observations histologiques et immunohistochimiques montrant une importante infiltration de ces tumeurs par des lymphocytes T CD3⁺ et des macrophages.

En conclusion, en regard d'un déficit des connaissances sur le MM humain, notre étude nous a permis d'identifier plusieurs protéines impliquées dans la transformation tumorale de ce cancer, dont la plupart sont déjà décrites dans le développement d'autres type de cancers. Les caractéristiques cellulaires et moléculaires spécifiques présentées par nos quatre modèles de MM de rat représentent de nouveaux outils intéressants pour les recherches de base en oncoimmunologie et en oncoprotéomique sur les types de cancers les plus agressifs. Ils représentent également une bonne base pour l'évaluation de thérapies innovantes, seules ou combinaison, en particulier dans le domaine de l'immunothérapie et de la virothérapie.

La virothérapie anti-tumorale ou immunothérapie oncolytique est une nouvelle stratégie thérapeutique en plein essor. Avec l'approbation du virus de l'herpès T-VEC pour le traitement du mélanome aux Etats Unis et en Europe et la présence de plusieurs autres virus oncolytiques (OV) en évaluation clinique de phase III [341], les OV prennent actuellement une place de plus en plus importante dans la recherche thérapeutique et l'arsenal clinique contre les cancers.

Parmi ces OV, les souches atténuées vaccinales du virus de la rougeole (MV) non modifiées sont étudiées pour leur activité oncolytique naturelle contre de nombreux types de cancers et sont actuellement évaluées cliniquement pour les patients atteints de cancer de l'ovaire [297], de myélome multiple [342], de mésothéliome (NCT01503177), de glioblastome multiforme

(NCT00390299), de cancer oro-pharyngé, de cancer du sein et de tumeurs de la gaine des nerfs périphériques (NCT01846091 et NCT02700230) [343].

Notre équipe a développé cette approche basée sur la souche Schwarz du MV pour le traitement du mésothéliome et a mis en évidence son effet oncolytique *in vitro* sur 70% des lignées de MM humains [256]. Malgré ses multiples propriétés naturelles anti-tumorales, des modifications de ce virus peuvent être générées pour améliorer son potentiel, en particulier la capacité à activer efficacement la réponse immunitaire qui est un atout pour le traitement du cancer. Un MV codant pour le gène de l'IFN- β murin, par exemple, a montré sa capacité à déclencher une infiltration de cellules immunitaires innées et à ralentir la croissance tumorale et l'angiogenèse chez des xénogreffes de mésothéliome humain [291]. De même, un MV codant pour le gène GM-CSF induit, dans un modèle murin de cancer colorectal, une infiltration des tumeurs sous-cutanées par des lymphocytes T accompagnée d'un retard de la propagation tumorale [91].

Durant ma thèse, j'ai étudié le MV- Δ C, qui est un MV Schwarz modifié de façon à ne plus exprimer l'un de ses facteurs de virulence, la protéine C. Il a été démontré que la protéine C inhibe la voie IFN de type I [344, 345] en antagonisant notamment les différentes activités de la PKR [245, 247], en empêchant la transcription de l'IFN- β [246] et en contrôlant la formation d'ARN doubles brins [248]. De même, la protéine C est impliquée dans le maintien de l'autophagie [250] et agit comme facteur de processivité pour l'ARN polymérase virale, modulant ainsi son engagement dans la transcription et la réplication du virus [249]. Ces différentes fonctions de la protéine C font d'elle une cible intéressante pour la modulation de la réponse immunitaire et l'amélioration de l'effet oncolytique du MV.

En partant de cette hypothèse, j'ai évalué, *in vitro* et *in vivo*, l'activité oncolytique du MV- Δ C en comparaison avec le MV pour le traitement du mésothéliome. Ce virus de la rougeole modifié, fourni par le Dr. Frédéric Tangy de l'Institut Pasteur, n'exprime pas la protéine C. Sur les 12 lignées de MM testées *in vitro*, nous avons pu démontrer que les cellules mésothéliales saines ainsi que les 3 lignées précédemment décrites comme résistantes au MV parental [256] étaient aussi résistantes au MV- Δ C. Parmi les lignées considérées comme sensibles à l'infection par le MV, 7 lignées étaient similairement voire plus sensibles à l'infection par le MV- Δ C alors que 2 étaient résistantes (Méso 35 et Méso 56). Cette sensibilité accrue se traduit par une augmentation de l'induction de la mort cellulaire accompagnée par une activation plus élevée des caspases 3 et 7. Ce potentiel oncolytique amélioré a été observé *in vivo* sur des souris NOD SCID transplantées

avec deux lignées de MM humains (Mésos 34 et Mésos 163). Les deux virus induisent des régressions tumorales qui sont significativement plus importantes avec le MV-ΔC.

Afin de mieux comprendre la raison pour laquelle les deux lignées sensibles au MV étaient résistantes au MV-ΔC, deux hypothèses ont été émises. La première consiste en l'incapacité du virus à inhiber la voie IFN de type I. Toutefois cette hypothèse a été rapidement abandonnée étant donné que nous n'avons pas pu améliorer l'effet oncolytique du MV-ΔC en prétraitant la lignée Mésos 35 par un inhibiteur de la voie IFN type I, le ruxolitinib. La deuxième hypothèse repose sur le fait que ces lignées entrent rapidement en apoptose en réponse au MV-ΔC qui n'a alors pas le temps de répliquer efficacement. Nous privilégions maintenant cette dernière hypothèse. Effectivement, en prétraitant avec un inhibiteur de caspases la lignée Mésos 35, une amélioration de l'infection et de la propagation du MV-ΔC a été observée par rapport aux cellules non traitées. Une autre hypothèse à prendre aussi en considération est le rôle que joue la voie PKR dans l'induction de la mort cellulaire. En effet, le MV-ΔC produit des doubles brins d'ARN qui vont déclencher l'apoptose suite à leur reconnaissance par la voie PKR. On peut alors imaginer que bloquer cette voie dans les lignées Mésos 35 et 56 pourrait améliorer la réplication du virus.

Les OV_s exercent leurs propriétés oncolytiques non seulement par la lyse directe des cellules tumorales mais aussi par l'activation de la réponse immunitaire. Cette activation est due à l'induction d'une mort cellulaire immunogène des cellules tumorales infectées qui vont alors libérer des signaux de dangers tels que HMGB1 [346]. Nos résultats ont montré que l'infection par les deux virus induisait une libération de HMGB1, mais que cette libération était beaucoup plus élevée dans le cas du MV-ΔC. Ce résultat corrèle avec la lyse cellulaire plus rapide induite par ce virus. Des études antérieures ont démontré que l'infection par un vaccin MV déficient pour la protéine C conduit à la production de grandes quantités de particules virales défectueuses et l'accumulation de doubles brins d'ARN viral (dsRNA) en raison du manque de processivité de la polymérase virale L en l'absence de la protéine C [248, 249]. Cela a été aussi observé dans notre étude où nous avons vu une quantité élevée de ces dsRNA dans le cytoplasme des cellules tumorales infectées par le MV-ΔC alors qu'ils étaient absents dans les cellules infectées par le MV. La production de particules défectives peut être considérée comme un inconvénient majeur pour l'effet oncolytique d'un virus car ce sont des activatrices puissantes de la voie PKR qui, activée, phosphoryle la protéine eIF2α et empêche l'initiation de la traduction des ARNm et limite la réplication virale. Cependant, nous n'avons observé aucune inhibition de l'effet oncolytique du

MV-ΔC dans la majorité des lignées sensibles de MM malgré la présence de ces dsRNA. En considérant l'activité immunothérapeutique des OV, la production de ces dsRNA pourrait même être un avantage pour activer les cellules immunitaires qui reconnaissent ce type de signal de danger telles que les cellules dendritiques. En effet, afin de tester l'immunogénicité de la mort cellulaire induite par MV-ΔC, nous avons incubé la lignée Meso 13, infectée par le MV ou le MV-ΔC, avec des cellules dendritiques immatures (iDCs) dérivées de monocytes humains de six donneurs sains et analysé leur maturation par cytométrie en flux. Nous avons observé que les deux virus induisaient la maturation des cellules dendritiques mais que cette dernière était plus importante dans le cas du MV-ΔC. Ce résultat suggère que la présence des dsRNA joue un rôle essentiel dans cette maturation améliorée. Cette hypothèse est confortée par le fait que le potentiel immunogène du MV-ΔC semble être dépendant de la réplication virale qui est nécessaire à la formation des dsRNA car l'inactivation du virus par exposition aux UV inhibe l'activation des DCs.

Les DCs peuvent reconnaître les particules virales via plusieurs voies de signalisation : TLR3 peut ainsi détecter la présence des dsRNA dans la voie endosomale alors que MDA5, RIG-I ou la PKR les reconnaissent dans le cytoplasme. Afin d'identifier, dans notre cas, la voie de signalisation impliquée dans l'activation des DCs, nous avons étudié de près TLR3 et PKR. Notre première hypothèse était que ces DCs étaient activées suite à la reconnaissance de dsRNA viraux par les TLR3 dans les endosomes après la phagocytose des fragments de cellules mortes. Toutefois, le blocage de cette voie par un inhibiteur compétitif n'a pas altéré la maturation des DCs infectées par MV ou MV-ΔC. En revanche, le blocage de la voie PKR par l'inhibiteur C16 a pu atténuer cette maturation. Ces observations suggèrent que l'activation des DCs a eu principalement lieu à travers la voie PKR cytoplasmique.

En conclusion, nos résultats montrent qu'en jouant sur le type et la cinétique de la mort cellulaire il est possible d'améliorer l'effet oncolytique du MV. Cependant, bien que le modèle de MM humain transplanté sur des souris immunodéficientes NOD SCID soit pertinent pour l'étude de l'effet oncolytique de nos virus *in vivo*, il ne nous permet pas d'explorer l'induction de la réponse immunitaire anti-tumorale qui accompagne l'infection. Nous souhaitons maintenant utiliser les modèles de MM de rats caractérisés dans mon premier sujet de thèse afin d'étudier l'induction de la réponse immunitaire anti-tumorale par le MV dans des animaux immunocompétents. Cependant, nous devons adapter ces modèles, car ils ne sont pas

naturellement sensibles à l'infection par le MV, en faisant notamment exprimer le récepteur CD46 humain et en cassant la voie IFN de type I.

Outre le MV, je me suis intéressée avec une autre doctorante, Tiphaine Delaunay, à l'étude de la sensibilité du MM à un autre virus oncolytique, celui de la vaccine (VV). Ce virus dérivé de la souche vaccinale Copenhagen, fourni par le Dr Philippe Erbs de l'entreprise Transgene, est délété pour la thymidine kinase (TK) et la ribonucléotide réductase (RR), et exprime la protéine GFP.

Dans notre étude, nous avons pu démontrer, *in vitro*, que l'ensemble de nos 22 lignées de MM était sensibles à l'infection et à l'activité oncolytique du VVTK⁻RR⁻/GFP. Une seule étude avait été publiée sur la sensibilité *in vitro* de six lignées de MM humaines à un VV oncolytique différent et montraient que toutes étaient sensibles [347]. Avec nos résultats, nous confirmons sur un nombre important de lignées humaines de MM cette sensibilité. Nous aurions aimé analyser l'expression du récepteur de ce virus sur les lignées tumorales, mais ce récepteur est mal défini et son expression est plutôt ubiquitaire, puisqu'il s'agit de groupements glucidiques complexes. De plus, même si toutes les lignées sont sensibles à l'effet oncolytique du VVTK⁻RR⁻/GFP, nous observons tout de même des différences de niveau de réplication du virus entre les lignées avec certaines capables de produire beaucoup plus de virus que d'autres. Il serait intéressant de déterminer si ces niveaux de réplication différents sont liés aux niveaux d'activités enzymatiques TK et RR endogènes dans les lignées de MM.

En outre, ces résultats suggèrent que la réponse IFN I ne semble pas protéger les cellules tumorales de la réplication du VVTK⁻RR⁻/GFP. En effet, nous avons récemment montré, sur les mêmes 22 lignées de MPM humaines, que 15 présentent des défauts dans la réponse IFN I, ce qui les rend sensibles au virus MV oncolytique [256]. Les 7 lignées restantes avaient la capacité de contrôler la réplication du MV par une réponse IFN I fonctionnelle. Nous avons pu démontrer, pour 3 de ces 7 lignées de MPM résistantes au MV, qu'elles ne sont pas capables de contrôler la réplication du VVTK⁻RR⁻/GFP. Ainsi, deux hypothèses potentielles peuvent être émises. Soit la réplication du VVTK⁻RR⁻/GFP est insensible à la voie IFN I, en raison de l'expression de facteurs de virulence tels que BR18 qui est capable de bloquer la réponse IFN I en se fixant aux IFN de type I et en les empêchant d'interagir avec leur récepteur IFNAR [348], ou des deux protéines A46R et A52R qui sont impliquées dans l'inhibition des voies de signalisation de NF- κ B et des

TLRs qui jouent un rôle majeur dans l'activation de l'IFN I [349]. Soit les lignées tumorales sont incapables de détecter le virus. La première hypothèse est celle que nous privilégions pour le moment et mériterait d'être testée en exposant les lignées de MM à des IFN I et en regardant si cela diminue la réplication du VVTK⁻/RR⁻/GFP. De plus, nous pourrions aussi exposer les lignées à un inhibiteur de la réponse IFN de type I comme le ruxolitinib et observer si cela augmente la réplication du virus.

Dans leur étude récente, Laurence Zitvogel et son équipe montrent qu'un VV dérivé de la souche Western Reserve (VVwr) semble être sensible à la voie IFN I [350]. Toutefois, ce résultat n'est pas tout à fait contradictoire avec le nôtre puisque la souche Copenhagen que nous utilisons est moins atténuée que les autres souches de la vaccine [351], ce qui pourrait expliquer son insensibilité à cette réponse antivirale. De plus, le VVwr a peut-être du mal à bloquer la réponse IFN I murine et de ce fait exerce une meilleure activité oncolytique lorsque les cellules tumorales ont une réponse IFN de type I non fonctionnelle.

Afin de confirmer nos observations *in vitro* sur l'efficacité oncolytique du VVTK⁻/RR⁻/GFP, nous avons étudié la capacité de ce virus à traiter des souris NOD SCID transplantées, par voie intrapéritonéale, avec la lignée de MM Més0 163. Nos résultats montrent que ce virus améliore significativement la médiane de survie des souris traitées et permet le développement de beaucoup moins de métastases en comparaison avec le groupe contrôle. Il est aussi possible que l'échec de ce virus à traiter totalement les souris soit dû à l'absence d'un système immunitaire adaptatif fonctionnel qui devrait améliorer l'efficacité oncolytique par l'induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale. En effet, il a été montré que la VV oncolytique induit une mort cellulaire immunogène qui permet aux cellules présentatrices d'antigènes d'initier la réponse de lymphocytes T naïfs pour développer une réponse immunitaire anti-tumorale [350, 352]. Nous avons également rapporté récemment que le VVTK⁻/RR⁻/GFP peut augmenter l'activation des cellules T CD4⁺ cytotoxiques effectrices en augmentant la présentation par le CMH de classe II des antigènes de tumeurs par les cellules tumorales elles-mêmes (Delaunay T, Oncoimmunology, en révision).

Le VVTK⁻/RR⁻/GFP que nous avons étudiés n'est pas armé avec un transgène thérapeutique. Nous pourrions attendre une meilleure efficacité si ce virus était armé avec un gène de suicide ou s'il codait pour des cytokines activatrices des CPAs telles que le GM-CSF. En effet, Transgene développe un VV TG6002 exprimant le gène de suicide Fcu1 qui est actuellement en

essai clinique pour le glioblastome récurrent (NCT03294486). Le JX-594 (Pexa-vec), un VV délété du gène TK et codant pour le gène GM-CSF, aussi exploité par Transgene, a donné des résultats cliniques très intéressants pour le traitement du cancer du foie dans un essai clinique de phase II [153] ce qui a conduit à un essai clinique de phase III qui est actuellement en cours d'évaluation (NCT02562755). Nous prévoyons de tester ce type de VV armés dans nos futures études.

Dans l'ensemble, nos résultats montrent que le MPM humain est très sensible au VVTK^{RR}/GFP. Toutefois, comme pour le MV, des modèles murins immunocompétents comme les modèles de rats que j'ai étudiés dans la première partie de ma thèse, s'il pouvaient être adaptés au VV, seraient un atout pour pouvoir aller plus loin dans nos recherches, étant donné le rôle que joue la réponse immunitaire dans la virothérapie anti-tumorale.

En conclusion, mes travaux de thèse apportent de nouvelles connaissances sur la virothérapie anti-tumorale du mésothéliome et le développement de nouveaux modèles précliniques de MM immunocompétents indispensables pour l'étude des immunothérapies. Ce travail pourra servir de base pour améliorer le diagnostic et envisager un meilleur traitement des patients souffrants de mésothéliome.

REFERENCES

1. Neumann, V., et al., *Malignant pleural mesothelioma: incidence, etiology, diagnosis, treatment, and occupational health*. Dtsch Arztebl Int, 2013. **110**(18): p. 319-26.
2. Kim, J., S. Bhagwandin, and D.M. Labow, *Malignant peritoneal mesothelioma: a review*. Ann Transl Med, 2017. **5**(11): p. 236.
3. Kebapci, M., et al., *CT findings and serum ca 125 levels in malignant peritoneal mesothelioma: report of 11 new cases and review of the literature*. Eur Radiol, 2003. **13**(12): p. 2620-6.
4. Mutsaers, S.E., *The mesothelial cell*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(1): p. 9-16.
5. Brochhausen, C., et al., *Current strategies and future perspectives for intraperitoneal adhesion prevention*. J Gastrointest Surg, 2012. **16**(6): p. 1256-74.
6. Robinson, B.M., *Malignant pleural mesothelioma: an epidemiological perspective*. Ann Cardiothorac Surg, 2012. **1**(4): p. 491-6.
7. Campbell, K., et al., *[Malignant pleural mesothelioma: 2013 state of the art]*. Bull Cancer, 2013. **100**(12): p. 1283-93.
8. Gilham, C., et al., *Pleural mesothelioma and lung cancer risks in relation to occupational history and asbestos lung burden*. Occup Environ Med, 2016. **73**(5): p. 290-9.
9. Zucali, P.A., et al., *Advances in the biology of malignant pleural mesothelioma*. Cancer Treat Rev, 2011. **37**(7): p. 543-58.
10. Mowe, G. and B. Gylseth, *Occupational exposure and regional variation of malignant mesothelioma in Norway, 1970-79*. Am J Ind Med, 1986. **9**(4): p. 323-32.
11. Rake, C., et al., *Occupational, domestic and environmental mesothelioma risks in the British population: a case-control study*. Br J Cancer, 2009. **100**(7): p. 1175-83.
12. Vianna, N.J. and A.K. Polan, *Non-occupational exposure to asbestos and malignant mesothelioma in females*. Lancet, 1978. **1**(8073): p. 1061-3.
13. Ferrante, D., et al., *Cancer mortality and incidence of mesothelioma in a cohort of wives of asbestos workers in Casale Monferrato, Italy*. Environ Health Perspect, 2007. **115**(10): p. 1401-5.
14. Pan, X.L., et al., *Residential proximity to naturally occurring asbestos and mesothelioma risk in California*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **172**(8): p. 1019-25.
15. Ruffié, P. and J. Margery, *Cancer et environnement : le cas de l'amiante*. Oncologie, 2007. **9**(5): p. 335-339.
16. Baris, B., et al., *Environmental fibrous zeolite (erionite) exposure and malignant tumors other than mesothelioma*. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 1996. **15**(2-4): p. 183-9.
17. Carthew, P., et al., *Intrapleural administration of fibres induces mesothelioma in rats in the same relative order of hazard as occurs in man after exposure*. Hum Exp Toxicol, 1992. **11**(6): p. 530-4.
18. Suzuki, Y. and N. Kohyama, *Malignant mesothelioma induced by asbestos and zeolite in the mouse peritoneal cavity*. Environ Res, 1984. **35**(1): p. 277-92.
19. Paoletti, L., et al., *Unusually high incidence of malignant pleural mesothelioma in a town of eastern Sicily: an epidemiological and environmental study*. Arch Environ Health, 2000. **55**(6): p. 392-8.
20. Comba, P., A. Gianfagna, and L. Paoletti, *Pleural mesothelioma cases in Biancavilla are related to a new fluoro-edenite fibrous amphibole*. Arch Environ Health, 2003. **58**(4): p. 229-32.
21. Manfredi, J.J., et al., *Evidence against a role for SV40 in human mesothelioma*. Cancer Res, 2005. **65**(7): p. 2602-9.
22. Leithner, K., et al., *Mesothelioma mortality in Europe: impact of asbestos consumption and simian virus 40*. Orphanet J Rare Dis, 2006. **1**: p. 44.
23. Wong, M., et al., *New associations of human papillomavirus, Simian virus 40, and Epstein-Barr virus with human cancer*. J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(24): p. 1832-6.

24. Kroczyńska, B., et al., *Crocidolite asbestos and SV40 are cocarcinogens in human mesothelial cells and in causing mesothelioma in hamsters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(38): p. 14128-33.
25. Carbone, M., et al., *A mesothelioma epidemic in Cappadocia: scientific developments and unexpected social outcomes*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(2): p. 147-54.
26. Ascoli, V., et al., *Familial malignant mesothelioma: a population-based study in central Italy (1980-2012)*. Cancer Epidemiol, 2014. **38**(3): p. 273-8.
27. Patel, S.C. and J.E. Dowell, *Modern management of malignant pleural mesothelioma*. Lung Cancer (Auckl), 2016. **7**: p. 63-72.
28. Hillegass, J.M., et al., *Inflammation precedes the development of human malignant mesotheliomas in a SCID mouse xenograft model*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1203**: p. 7-14.
29. Choe, N., et al., *Pleural macrophage recruitment and activation in asbestos-induced pleural injury*. Environ Health Perspect, 1997. **105 Suppl 5**: p. 1257-60.
30. Chow, M.T., et al., *NLRP3 promotes inflammation-induced skin cancer but is dispensable for asbestos-induced mesothelioma*. Immunol Cell Biol, 2012. **90**(10): p. 983-6.
31. Carbone, M. and H. Yang, *Molecular pathways: targeting mechanisms of asbestos and erionite carcinogenesis in mesothelioma*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(3): p. 598-604.
32. Acencio, M.M., et al., *Inflammatory Cytokines Contribute to Asbestos-Induced Injury of Mesothelial Cells*. Lung, 2015. **193**(5): p. 831-7.
33. Comar, M., et al., *Chemokines involved in the early inflammatory response and in pro-tumoral activity in asbestos-exposed workers from an Italian coastal area with territorial clusters of pleural malignant mesothelioma*. Lung Cancer, 2016. **94**: p. 61-7.
34. Blanquart, C., et al., *CCL2, galectin-3, and SMRP combination improves the diagnosis of mesothelioma in pleural effusions*. J Thorac Oncol, 2012. **7**(5): p. 883-9.
35. Xu, J., et al., *Chemokine (C-C motif) ligand 3 detection in the serum of persons exposed to asbestos: A patient-based study*. Cancer Sci, 2015. **106**(7): p. 825-32.
36. Sekido, Y., *Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma*. Carcinogenesis, 2013. **34**(7): p. 1413-9.
37. Wong, L., et al., *Inactivation of p16INK4a expression in malignant mesothelioma by methylation*. Lung Cancer, 2002. **38**(2): p. 131-6.
38. Yang, C.T., et al., *Adenovirus-mediated p14(ARF) gene transfer in human mesothelioma cells*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(8): p. 636-41.
39. Cheng, J.Q., et al., *Frequent mutations of NF2 and allelic loss from chromosome band 22q12 in malignant mesothelioma: evidence for a two-hit mechanism of NF2 inactivation*. Genes Chromosomes Cancer, 1999. **24**(3): p. 238-42.
40. Edwards, J.G., et al., *EGFR expression: associations with outcome and clinicopathological variables in malignant pleural mesothelioma*. Lung Cancer, 2006. **54**(3): p. 399-407.
41. Filiberti, R., et al., *Serum PDGF-AB in pleural mesothelioma*. Tumour Biol, 2005. **26**(5): p. 221-6.
42. Demirag, F., et al., *Prognostic significance of vascular endothelial growth factor, tumor necrosis, and mitotic activity index in malignant pleural mesothelioma*. Chest, 2005. **128**(5): p. 3382-7.
43. Tolnay, E., et al., *Hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor c-Met are overexpressed and associated with an increased microvessel density in malignant pleural mesothelioma*. J Cancer Res Clin Oncol, 1998. **124**(6): p. 291-6.
44. Hopkins-Donaldson, S., et al., *Induction of apoptosis and chemosensitization of mesothelioma cells by Bcl-2 and Bcl-xL antisense treatment*. Int J Cancer, 2003. **106**(2): p. 160-6.
45. Dhaene, K., et al., *Expression profile of telomerase subunits in human pleural mesothelioma*. J Pathol, 2000. **190**(1): p. 80-5.

46. Zamarron, B. and W. Chen, *Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression*. Int J Biol Sci., 2011(7(5):651-8).
47. Vinay, D.S., et al., *Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies*. Semin Cancer Biol, 2015. **35 Suppl**: p. S185-98.
48. Jacobs, J.F., et al., *Regulatory T cells in melanoma: the final hurdle towards effective immunotherapy?* Lancet Oncol, 2012. **13**(1): p. e32-42.
49. Zou, W., *Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(4): p. 295-307.
50. DeLong, P., et al., *Regulatory T cells and cytokines in malignant pleural effusions secondary to mesothelioma and carcinoma*. Cancer Biol Ther, 2005. **4**(3): p. 342-6.
51. Hegmans, J.P., et al., *Mesothelioma environment comprises cytokines and T-regulatory cells that suppress immune responses*. Eur Respir J, 2006. **27**(6): p. 1086-95.
52. Seung, L., et al., *Synergy between T-cell immunity and inhibition of paracrine stimulation causes tumor rejection*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1995(3;92(14):6254-8).
53. Garrido, F., et al., *Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours*. Immunol Today, 1997. **18**(2): p. 89-95.
54. Hicklin, D.J., F.M. Marincola, and S. Ferrone, *HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story*. Mol Med Today, 1999. **5**(4): p. 178-86.
55. Chene, A.L., et al., *Pleural Effusions from Patients with Mesothelioma Induce Recruitment of Monocytes and Their Differentiation into M2 Macrophages*. J Thorac Oncol, 2016. **11**(10): p. 1765-73.
56. Thapa, B., D.N. Watkins, and T. John, *Immunotherapy for malignant mesothelioma: reality check*. Expert Rev Anticancer Ther, 2016: p. 1-10.
57. Nickell, L.T., Jr., et al., *Multimodality imaging for characterization, classification, and staging of malignant pleural mesothelioma*. Radiographics, 2014. **34**(6): p. 1692-706.
58. Wechsler, R.J., V.M. Rao, and R.M. Steiner, *The radiology of thoracic malignant mesothelioma*. Crit Rev Diagn Imaging, 1984. **20**(4): p. 283-310.
59. Bonomi, M., et al., *Clinical staging of malignant pleural mesothelioma: current perspectives*. Lung Cancer (Auckl), 2017. **8**: p. 127-139.
60. Robinson, B.W. and R.A. Lake, *Advances in malignant mesothelioma*. N Engl J Med, 2005. **353**(15): p. 1591-603.
61. Scherpereel, A., et al., *Guidelines of the European Respiratory Society and the European Society of Thoracic Surgeons for the management of malignant pleural mesothelioma*. Eur Respir J, 2010. **35**(3): p. 479-95.
62. Robinson, B.W., et al., *Mesothelin-family proteins and diagnosis of mesothelioma*. Lancet, 2003. **362**(9396): p. 1612-6.
63. Creaney, J., et al., *Soluble mesothelin in effusions: a useful tool for the diagnosis of malignant mesothelioma*. Thorax, 2007. **62**(7): p. 569-76.
64. Pass, H.I., et al., *Asbestos exposure, pleural mesothelioma, and serum osteopontin levels*. N Engl J Med, 2005. **353**(15): p. 1564-73.
65. Tabata, C., et al., *Serum HMGB1 as a diagnostic marker for malignant peritoneal mesothelioma*. J Clin Gastroenterol, 2013(47(8):684-8).
66. Creaney, J., et al., *Comparison of osteopontin, megakaryocyte potentiating factor, and mesothelin proteins as markers in the serum of patients with malignant mesothelioma*. J Thorac Oncol, 2008. **3**(8): p. 851-7.
67. Ren, R., et al., *Diagnostic value of fibulin-3 for malignant pleural mesothelioma: A systematic review and meta-analysis*. Oncotarget, 2016. **7**(51): p. 84851-84859.

68. Gueugnon, F., et al., *Identification of novel markers for the diagnosis of malignant pleural mesothelioma*. Am J Pathol, 2011. **178**(3): p. 1033-42.
69. van Zandwijk, N., et al., *Guidelines for the diagnosis and treatment of malignant pleural mesothelioma*. J Thorac Dis, 2013. **5**(6): p. E254-307.
70. Franklin, P., et al., *Asbestos exposure and histological subtype of malignant mesothelioma*. Occup Environ Med, 2016. **73**(11): p. 749-752.
71. Bille, A., et al., *Contemporary Analysis of Prognostic Factors in Patients with Unresectable Malignant Pleural Mesothelioma*. J Thorac Oncol, 2016. **11**(2): p. 249-55.
72. Klebe, S., et al., *Sarcomatoid mesothelioma: a clinical-pathologic correlation of 326 cases*. Mod Pathol, 2010. **23**(3): p. 470-9.
73. Henderson, D.W., et al., *Challenges and controversies in the diagnosis of malignant mesothelioma: Part 2. Malignant mesothelioma subtypes, pleural synovial sarcoma, molecular and prognostic aspects of mesothelioma, BAP1, aquaporin-1 and microRNA*. J Clin Pathol, 2013. **66**(10): p. 854-61.
74. Inai, K., *Pathology of mesothelioma*. Environ Health Prev Med, 2008. **13**(2): p. 60-4.
75. Papaspyros, S. and S. Papaspyros, *Surgical management of malignant pleural mesothelioma: impact of surgery on survival and quality of life-relation to chemotherapy, radiotherapy, and alternative therapies*. ISRN Surg, 2014. **2014**: p. 817203.
76. Cao, C., et al., *A systematic review and meta-analysis of surgical treatments for malignant pleural mesothelioma*. Lung Cancer, 2014. **83**(2): p. 240-5.
77. Vogelzang, N.J., et al., *Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma*. J Clin Oncol, 2003. **21**(14): p. 2636-44.
78. Scherpereel, A. and G. French Speaking Society for Chest Medicine Experts, *Guidelines of the French Speaking Society for Chest Medicine for management of malignant pleural mesothelioma*. Respir Med, 2007. **101**(6): p. 1265-76.
79. van Meerbeeck, J., et al., *Randomized phase III study of cisplatin with or without raltitrexed in patients with malignant pleural mesothelioma: an intergroup study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Lung Cancer Group and the National Cancer Institute of Canada*. J Clin Oncol. , 2005. **1;23(28):6881-9**.
80. Berghmans, T., et al., *Activity of chemotherapy and immunotherapy on malignant mesothelioma: a systematic review of the literature with meta-analysis*. Lung Cancer, 2002. **38**(2): p. 111-21.
81. Rusch, V.W., et al., *A phase II trial of surgical resection and adjuvant high-dose hemithoracic radiation for malignant pleural mesothelioma*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2001. **122**(4): p. 788-95.
82. Baldini, E.H., *External beam radiation therapy for the treatment of pleural mesothelioma*. Thorac Surg Clin, 2004. **14**(4): p. 543-8.
83. Dhalluin, X. and A. Scherpereel, *Chemotherapy and radiotherapy for mesothelioma*. Recent Results Cancer Res, 2011. **189**: p. 127-47.
84. Krug, L.M., et al., *Multicenter phase II trial of neoadjuvant pemetrexed plus cisplatin followed by extrapleural pneumonectomy and radiation for malignant pleural mesothelioma*. J Clin Oncol, 2009. **27**(18): p. 3007-13.
85. Bolukbas, S., et al., *Survival after trimodality therapy for malignant pleural mesothelioma: Radical Pleurectomy, chemotherapy with Cisplatin/Pemetrexed and radiotherapy*. Lung Cancer, 2011. **71**(1): p. 75-81.
86. Van Schil, P.E., et al., *Trimodality therapy for malignant pleural mesothelioma: results from an EORTC phase II multicentre trial*. Eur Respir J, 2010. **36**(6): p. 1362-9.

87. Castagneto, B., et al., *Palliative and therapeutic activity of IL-2 immunotherapy in unresectable malignant pleural mesothelioma with pleural effusion: Results of a phase II study on 31 consecutive patients*. Lung Cancer, 2001. **31**(2-3): p. 303-10.
88. Lucchi, M., et al., *Four-modality therapy in malignant pleural mesothelioma: a phase II study*. J Thorac Oncol, 2007. **2**(3): p. 237-42.
89. Boutin, C., et al., *Intrapleural treatment with recombinant gamma-interferon in early stage malignant pleural mesothelioma*. Cancer, 1994. **74**(9): p. 2460-7.
90. Stermán, D.H., et al., *A phase I clinical trial of single-dose intrapleural IFN-beta gene transfer for malignant pleural mesothelioma and metastatic pleural effusions: high rate of antitumor immune responses*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(15 Pt 1): p. 4456-66.
91. Stermán, D., et al., *A trial of intrapleural adenoviral-mediated Interferon- α 2b gene transfer for malignant pleural mesothelioma*. Am J Respir Crit Care Med, 2011(184(12):1395-9).
92. Stermán, D., et al., *Pilot and Feasibility Trial Evaluating Immuno-Gene Therapy of Malignant Mesothelioma Using Intrapleural Delivery of Adenovirus-IFN α Combined with Chemotherapy*. Clin Cancer Res, 2016(22(15):3791-800).
93. Hassan, R., et al., *Major cancer regressions in mesothelioma after treatment with an anti-mesothelin immunotoxin and immune suppression*. Sci Transl Med, 2013. **5**(208): p. 208ra147.
94. Hassan, R., et al., *Phase I study of SS1P, a recombinant anti-mesothelin immunotoxin given as a bolus I.V. infusion to patients with mesothelin-expressing mesothelioma, ovarian, and pancreatic cancers*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(17): p. 5144-9.
95. Lanitis, E., et al., *Redirected antitumor activity of primary human lymphocytes transduced with a fully human anti-mesothelin chimeric receptor*. Mol Ther, 2012. **20**(3): p. 633-43.
96. Schubert, P.C., et al., *Treatment of malignant pleural mesothelioma by fibroblast activation protein-specific re-directed T cells*. J Transl Med, 2013. **11**: p. 187.
97. Hegmans, J.P., et al., *Consolidative dendritic cell-based immunotherapy elicits cytotoxicity against malignant mesothelioma*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **181**(12): p. 1383-90.
98. Cornelissen, R., et al., *Extended Tumor Control after Dendritic Cell Vaccination with Low-Dose Cyclophosphamide as Adjuvant Treatment in Patients with Malignant Pleural Mesothelioma*. Am J Respir Crit Care Med, 2016. **193**(9): p. 1023-31.
99. Krug, L.M., et al., *WT1 peptide vaccinations induce CD4 and CD8 T cell immune responses in patients with mesothelioma and non-small cell lung cancer*. Cancer Immunol Immunother, 2010. **59**(10): p. 1467-79.
100. Calabro, L., et al., *Efficacy and safety of an intensified schedule of tremelimumab for chemotherapy-resistant malignant mesothelioma: an open-label, single-arm, phase 2 study*. Lancet Respir Med, 2015. **3**(4): p. 301-9.
101. Maio, M., et al., *Tremelimumab as second-line or third-line treatment in relapsed malignant mesothelioma (DETERMINE): a multicentre, international, randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial*. Lancet Oncol, 2017. **18**(9): p. 1261-1273.
102. Cedres, S., et al., *Analysis of expression of programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1) in malignant pleural mesothelioma (MPM)*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0121071.
103. Mansfield, A.S., et al., *B7-H1 expression in malignant pleural mesothelioma is associated with sarcomatoid histology and poor prognosis*. J Thorac Oncol, 2014. **9**(7): p. 1036-40.
104. Alley, E.W., et al., *Clinical safety and activity of pembrolizumab in patients with malignant pleural mesothelioma (KEYNOTE-028): preliminary results from a non-randomised, open-label, phase 1b trial*. Lancet Oncol, 2017. **18**(5): p. 623-630.
105. Garland, L.L., et al., *Phase II study of erlotinib in patients with malignant pleural mesothelioma: a Southwest Oncology Group Study*. J Clin Oncol, 2007. **25**(17): p. 2406-13.

106. Govindan, R., et al., *Gefitinib in patients with malignant mesothelioma: a phase II study by the Cancer and Leukemia Group B*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(6): p. 2300-4.
107. Hoang, C.D., et al., *Selective activation of insulin receptor substrate-1 and -2 in pleural mesothelioma cells: association with distinct malignant phenotypes*. Cancer Res, 2004. **64**(20): p. 7479-85.
108. Christoph, D.C. and W.E. Eberhardt, *Systemic treatment of malignant pleural mesothelioma: new agents in clinical trials raise hope of relevant improvements*. Curr Opin Oncol, 2014. **26**(2): p. 171-81.
109. Zalcman, G., et al., *Bevacizumab for newly diagnosed pleural mesothelioma in the Mesothelioma Avastin Cisplatin Pemetrexed Study (MAPS): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial*. Lancet, 2016. **387**(10026): p. 1405-1414.
110. Paik, P.K. and L.M. Krug, *Histone deacetylase inhibitors in malignant pleural mesothelioma: preclinical rationale and clinical trials*. J Thorac Oncol, 2010. **5**(2): p. 275-9.
111. Guillot, F., et al., *Vaccination with epigenetically treated mesothelioma cells induces immunisation and blocks tumour growth*. Vaccine, 2011. **29**(33): p. 5534-43.
112. Krug, L.M., et al., *Potential role of histone deacetylase inhibitors in mesothelioma: clinical experience with suberoylanilide hydroxamic acid*. Clin Lung Cancer, 2006. **7**(4): p. 257-61.
113. Krug, L.M., et al., *Vorinostat in patients with advanced malignant pleural mesothelioma who have progressed on previous chemotherapy (VANTAGE-014): a phase 3, double-blind, randomised, placebo-controlled trial*. Lancet Oncol, 2015. **16**(4): p. 447-56.
114. Scherpereel, A., et al., *Valproate-doxorubicin: promising therapy for progressing mesothelioma. A phase II study*. Eur Respir J, 2011. **37**(1): p. 129-35.
115. Bahhaj, F.e., et al., *Histone Deacetylase Inhibitors Delivery using Nanoparticles with Intrinsic Passive Tumor Targeting Properties for Tumor Therapy*. Theranostics, 2016(6(6): 795–807.).
116. Leclercq, S., et al., *A 5-aza-2'-deoxycytidine/valproate combination induces cytotoxic T-cell response against mesothelioma*. Eur Respir J, 2011. **38**(5): p. 1105-16.
117. Cleo, R., et al., *Mouse models of mesothelioma: strengths, limitations and clinical translation*. ResearchGate, 2014. **397–410**.
118. Yanagihara, K., et al., *An orthotopic implantation mouse model of human malignant pleural mesothelioma for in vivo photon counting analysis and evaluation of the effect of S-1 therapy*. Int J Cancer, 2010. **126**(12): p. 2835-46.
119. Spugnini, E.P., et al., *Piroxicam and cisplatin in a mouse model of peritoneal mesothelioma*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(20 Pt 1): p. 6133-43.
120. Cook, J.W., et al., *Suramin inhibits the growth of malignant mesothelioma in vitro, and in vivo, in murine flank and intraperitoneal models*. Lung Cancer, 2003. **42**(3): p. 263-74.
121. Macura, S.L., et al., *Microspheres targeted with a mesothelin antibody and loaded with doxorubicin reduce tumor volume of human mesotheliomas in xenografts*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 400.
122. Di Marzo, D., et al., *Pharmacological targeting of p53 through RITA is an effective antitumoral strategy for malignant pleural mesothelioma*. Cell Cycle, 2014. **13**(4): p. 652-65.
123. Workman, P., et al., *Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research*. Br J Cancer, 2010. **102**(11): p. 1555-77.
124. Denis, I., et al., *Vorinostat-polymer conjugate nanoparticles for Acid-responsive delivery and passive tumor targeting*. Biomacromolecules, 2014. **15**(12): p. 4534-43.
125. Gueugnon, F., et al., *Nanoparticles produced by ring-opening metathesis polymerization using norbornenyl-poly(ethylene oxide) as a ligand-free generic platform for highly selective in vivo tumor targeting*. Biomacromolecules, 2013. **14**(7): p. 2396-402.

126. Mezzapelle, R., et al., *Human malignant mesothelioma is recapitulated in immunocompetent BALB/c mice injected with murine AB cells*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 22850.
127. Fox, S.A., et al., *Cisplatin and TNF-alpha downregulate transcription of Bcl-xL in murine malignant mesothelioma cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **337**(3): p. 983-91.
128. Friedlander, P.L., et al., *Efficacy of CD40 ligand gene therapy in malignant mesothelioma*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. **29**(3 Pt 1): p. 321-30.
129. Anraku, M., et al., *Synergistic antitumor effects of regulatory T cell blockade combined with pemetrexed in murine malignant mesothelioma*. J Immunol, 2010. **185**(2): p. 956-66.
130. Pouliquen, D.L., *The rat in cancer research: a crucial tool for all aspects of translational studies*. 2012.
131. Gould, D.H., *Mesotheliomas of the tunica vaginalis propria and peritoneum in Fischer rats*. Vet Pathol, 1977. **14**(4): p. 372-9.
132. Shibuya, K., M. Tajima, and J. Yamate, *Histological classification of 62 spontaneous mesotheliomas in F344 rats*. Nihon Juigaku Zasshi, 1990. **52**(6): p. 1313-7.
133. Kuwahara, M., et al., *Establishment and characterization of spontaneous mesothelioma cell lines derived from F344 rats*. Virchows Arch, 1997. **431**(4): p. 257-63.
134. Wagner, J.C., *Experimental production of mesothelial tumours of the pleura by implantation of dusts in laboratory animals*. Nature, 1962. **196**: p. 180-1.
135. Wagner, J.C. and G. Berry, *Mesotheliomas in rats following inoculation with asbestos*. Br J Cancer, 1969. **23**(3): p. 567-81.
136. Shin, M.L. and H.I. Firminger, *Acute and chronic effects of intraperitoneal injection of two types of asbestos in rats with a study of the histopathogenesis and ultrastructure of resulting mesotheliomas*. Am J Pathol, 1973. **70**(3): p. 291-313.
137. Craighead, J.E., et al., *Characteristics of tumors and tumor cells cultured from experimental asbestos-induced mesotheliomas in rats*. Am J Pathol, 1987. **129**(3): p. 448-62.
138. Ampollini, L., et al., *Immuno-chemotherapy reduces recurrence of malignant pleural mesothelioma: an experimental setting*. Eur J Cardiothorac Surg, 2009. **35**(3): p. 457-62.
139. Zhong, J., et al., *Rat mesothelioma cell proliferation requires p38delta mitogen activated protein kinase and C/EBP-alpha*. Lung Cancer, 2011. **73**(2): p. 166-70.
140. http://www.inserm-transfert.fr/images/DOWNLOADS/2013_INSERTM_Research_tools_Catalogue_24072013x.pdf.
141. Roulois, D., et al., *Characterization of preneoplastic and neoplastic rat mesothelial cell lines: the involvement of TETs, DNMTs, and 5-hydroxymethylcytosine*. Oncotarget, 2016. **7**(23): p. 34664-87.
142. Pouliquen, D.L., et al., *Evaluation of intracavitary administration of curcumin for the treatment of sarcomatoid mesothelioma*. Oncotarget, 2017. **8**(34): p. 57552-57573.
143. Kim, Y., et al., *Major carcinogenic pathways identified by gene expression analysis of peritoneal mesotheliomas following chemical treatment in F344 rats*. Toxicol Appl Pharmacol, 2006. **214**(2): p. 144-51.
144. Walker, C., et al., *Wilms' tumor suppressor gene expression in rat and human mesothelioma*. Cancer Res, 1994. **54**(12): p. 3101-6.
145. Sinkovics, J.G. and J.C. Horvath, *Natural and genetically engineered viral agents for oncolysis and gene therapy of human cancers*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2008. **56 Suppl 1**: p. 3s-59s.
146. Choi, A.H., et al., *From Benchtop to Bedside: A Review of Oncolytic Virotherapy*. Biomedicines, 2016. **4**(3).
147. Parato, K., et al., *Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours*. Nat Rev Cancer., 2005(5(12):965-76.).

148. Roberto, C., et al., *Reprogrammed viruses as cancer therapeutics: targeted, armed and shielded*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6(7)**: 529–540.
149. Russell, S.J., K.W. Peng, and J.C. Bell, *Oncolytic virotherapy*. Nat Biotechnol, 2012. **30(7)**: p. 658-70.
150. Geisler, A. and H. Fechner, *MicroRNA-regulated viral vectors for gene therapy*. World J Exp Med, 2016. **6(2)**: p. 37-54.
151. Chen, T., et al., *Heat shock protein 70, released from heat-stressed tumor cells, initiates antitumor immunity by inducing tumor cell chemokine production and activating dendritic cells via TLR4 pathway*. J Immunol, 2009. **182(3)**: p. 1449-59.
152. Parviainen, S., et al., *CD40 ligand and tdTomato-armed vaccinia virus for induction of antitumor immune response and tumor imaging*. Gene Ther, 2014. **21(2)**: p. 195-204.
153. Heo, J., et al., *Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer*. Nat Med, 2013. **19(3)**: p. 329-36.
154. Park, S.H., et al., *Phase 1b Trial of Biweekly Intravenous Pexa-Vec (JX-594), an Oncolytic and Immunotherapeutic Vaccinia Virus in Colorectal Cancer*. Mol Ther, 2015. **23(9)**: p. 1532-40.
155. Belin, L.J., et al., *An oncolytic vaccinia virus expressing the human sodium iodine symporter prolongs survival and facilitates SPECT/CT imaging in an orthotopic model of malignant pleural mesothelioma*. Surgery, 2013. **154(3)**: p. 486-95.
156. Acuna, S., et al., *Oncolytic vaccinia virus as an adjuvant treatment to cytoreductive surgery for malignant peritoneal mesothelioma*. Ann Surg Oncol, 2014((7):2259-66).
157. Kaufman, H.L., F.J. Kohlhapp, and A. Zloza, *Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs*. Nat Rev Drug Discov, 2015. **14(9)**: p. 642-62.
158. Niemann, J. and F. Kuhnel, *Oncolytic viruses: adenoviruses*. Virus Genes, 2017.
159. Garber, K., *China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment*. J Natl Cancer Inst, 2006. **98(5)**: p. 298-300.
160. Boisgerault, N., et al., *Oncolytic virotherapy for human malignant mesothelioma: recent advances*. Oncolytic Virother, 2015. **4**: p. 133-40.
161. Kaufman, H.L., et al., *Local and distant immunity induced by intralesional vaccination with an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF in patients with stage IIIc and IV melanoma*. Ann Surg Oncol, 2010. **17(3)**: p. 718-30.
162. Andtbacka, R.H., et al., *Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma*. J Clin Oncol, 2015. **33(25)**: p. 2780-8.
163. Geletneky, K., et al., *Phase I/IIa study of intratumoral/intracerebral or intravenous/intracerebral administration of Parvovirus H-1 (ParvOryx) in patients with progressive primary or recurrent glioblastoma multiforme: ParvOryx01 protocol*. BMC Cancer, 2012. **12**: p. 99.
164. Grekova, S., et al., *Immune cells participate in the oncosuppressive activity of parvovirus H-1PV and are activated as a result of their abortive infection with this agent*. Cancer Biol Ther, 2010. **10(12)**: p. 1280-9.
165. Comins, C., et al., *REO-10: a phase I study of intravenous reovirus and docetaxel in patients with advanced cancer*. Clin Cancer Res, 2010. **16(22)**: p. 5564-72.
166. Washburn, B. and V. Schirmacher, *Human tumor cell infection by Newcastle Disease Virus leads to upregulation of HLA and cell adhesion molecules and to induction of interferons, chemokines and finally apoptosis*. Int J Oncol, 2002. **21(1)**: p. 85-93.
167. Freeman, A.I., et al., *Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme*. Mol Ther, 2006. **13(1)**: p. 221-8.
168. Laurie, S.A., et al., *A phase 1 clinical study of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, using two-step desensitization*. Clin Cancer Res, 2006. **12(8)**: p. 2555-62.

169. Silberhumer, G.R., et al., *Genetically engineered oncolytic Newcastle disease virus effectively induces sustained remission of malignant pleural mesothelioma*. Mol Cancer Ther, 2010. **9**(10): p. 2761-9.
170. Merrill, M.K., et al., *Poliovirus receptor CD155-targeted oncolysis of glioma*. Neuro Oncol, 2004. **6**(3): p. 208-17.
171. Gromeier, M., et al., *Intergeneric poliovirus recombinants for the treatment of malignant glioma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6803-8.
172. Altomonte, J., et al., *Synergistic antitumor effects of transarterial viroembolization for multifocal hepatocellular carcinoma in rats*. Hepatology, 2008. **48**(6): p. 1864-73.
173. Hastie, E., et al., *Oncolytic vesicular stomatitis virus in an immunocompetent model of MUC1-positive or MUC1-null pancreatic ductal adenocarcinoma*. J Virol, 2013. **87**(18): p. 10283-94.
174. Willmon, C., et al., *Expression of IFN-beta enhances both efficacy and safety of oncolytic vesicular stomatitis virus for therapy of mesothelioma*. Cancer Res. , 2009(69(19):7713-20).
175. Saloura, V., et al., *Evaluation of an attenuated vesicular stomatitis virus vector expressing interferon-beta for use in malignant pleural mesothelioma: heterogeneity in interferon responsiveness defines potential efficacy*. Hum Gene Ther, 2010. **21**(1): p. 51-64.
176. Rudin, C.M., et al., *Phase I clinical study of Seneca Valley Virus (SVV-001), a replication-competent picornavirus, in advanced solid tumors with neuroendocrine features*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(4): p. 888-95.
177. de Vries, R.D. and R.L. de Swart, *Measles immune suppression: functional impairment or numbers game?* PLoS Pathog, 2014. **10**(12): p. e1004482.
178. Young, V.A. and G.F. Rall, *Making it to the synapse: measles virus spread in and among neurons*. Curr Top Microbiol Immunol, 2009. **330**: p. 3-30.
179. de Vries, R.D., et al., *The pathogenesis of measles*. Curr Opin Virol, 2012. **2**(3): p. 248-55.
180. Enders, J.F. and T.C. Peebles, *Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles*. Proc Soc Exp Biol Med, 1954. **86**(2): p. 277-86.
181. Bankamp, B., et al., *Genetic characterization of measles vaccine strains*. J Infect Dis, 2011. **204 Suppl 1**: p. S533-48.
182. Parks, C.L., et al., *Comparison of predicted amino acid sequences of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage*. J Virol, 2001. **75**(2): p. 910-20.
183. Moss, W.J. and D.E. Griffin, *Measles*. Lancet, 2012. **379**(9811): p. 153-64.
184. Combredet, C., 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): p. 11546-54.
185. Minor, P.D., *Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges*. Virology, 2015. **479-480**: p. 379-92.
186. Griffin, D.E., C.H. Pan, and W.J. Moss, *Measles vaccines*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 1352-70.
187. Gay, N.J., *The theory of measles elimination: implications for the design of elimination strategies*. J Infect Dis, 2004. **189 Suppl 1**: p. S27-35.
188. Griffin, D.E. and C.H. Pan, *Measles: old vaccines, new vaccines*. Curr Top Microbiol Immunol, 2009. **330**: p. 191-212.
189. Wolfson, L.J., et al., *Has the 2005 measles mortality reduction goal been achieved? A natural history modelling study*. Lancet, 2007. **369**(9557): p. 191-200.
190. Moss, W.J. and D.E. Griffin, *Global measles elimination*. Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(12): p. 900-8.
191. Jansen, V.A., et al., *Measles outbreaks in a population with declining vaccine uptake*. Science, 2003. **301**(5634): p. 804.
192. Aref, S., K. Bailey, and A. Fielding, *Measles to the Rescue: A Review of Oncolytic Measles Virus*. Viruses, 2016. **8**(10).

193. Yanagi, Y., M. Takeda, and S. Ohno, *Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 10): p. 2767-79.
194. Wild, T.F. and R. Buckland, *Functional aspects of envelope-associated measles virus proteins*. Curr Top Microbiol Immunol, 1995. **191**: p. 51-64.
195. Longhi, S., et al., *The C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein is intrinsically disordered and folds upon binding to the C-terminal moiety of the phosphoprotein*. J Biol Chem, 2003. **278**(20): p. 18638-48.
196. Zhang, X., et al., *Hsp72 recognizes a P binding motif in the measles virus N protein C-terminus*. Virology, 2005. **337**(1): p. 162-74.
197. Carsillo, T., et al., *A single codon in the nucleocapsid protein C terminus contributes to in vitro and in vivo fitness of Edmonston measles virus*. J Virol, 2006. **80**(6): p. 2904-12.
198. Gutsche, I., et al., *Structural virology. Near-atomic cryo-EM structure of the helical measles virus nucleocapsid*. Science, 2015. **348**(6235): p. 704-7.
199. Shu, Y., et al., *Plasticity in structural and functional interactions between the phosphoprotein and nucleoprotein of measles virus*. J Biol Chem, 2012. **287**(15): p. 11951-67.
200. Grdzlishvili, V.Z., et al., *A single amino acid change in the L-polymerase protein of vesicular stomatitis virus completely abolishes viral mRNA cap methylation*. J Virol, 2005. **79**(12): p. 7327-37.
201. Ogino, T., et al., *Sendai virus RNA-dependent RNA polymerase L protein catalyzes cap methylation of virus-specific mRNA*. J Biol Chem, 2005. **280**(6): p. 4429-35.
202. Poch, O., et al., *Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains*. J Gen Virol, 1990. **71** (Pt 5): p. 1153-62.
203. McIlhatton, M.A., M.D. Curran, and B.K. Rima, *Nucleotide sequence analysis of the large (L) genes of phocine distemper virus and canine distemper virus (corrected sequence)*. J Gen Virol, 1997. **78** (Pt 3): p. 571-6.
204. Iwasaki, M., et al., *The matrix protein of measles virus regulates viral RNA synthesis and assembly by interacting with the nucleocapsid protein*. J Virol, 2009. **83**(20): p. 10374-83.
205. Reuter, T., et al., *RNA interference with measles virus N, P, and L mRNAs efficiently prevents and with matrix protein mRNA enhances viral transcription*. J Virol, 2006. **80**(12): p. 5951-7.
206. Tahara, M., M. Takeda, and Y. Yanagi, *Altered interaction of the matrix protein with the cytoplasmic tail of hemagglutinin modulates measles virus growth by affecting virus assembly and cell-cell fusion*. J Virol, 2007. **81**(13): p. 6827-36.
207. Wakimoto, H., et al., *F-actin modulates measles virus cell-cell fusion and assembly by altering the interaction between the matrix protein and the cytoplasmic tail of hemagglutinin*. J Virol, 2013. **87**(4): p. 1974-84.
208. Zhu, J., et al., *The fusion protein core of measles virus forms stable coiled-coil trimer*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **299**(5): p. 897-902.
209. Hashiguchi, T., et al., *Structure of the measles virus hemagglutinin bound to its cellular receptor SLAM*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(2): p. 135-41.
210. Zhang, X., et al., *Structure of measles virus hemagglutinin bound to its epithelial receptor nectin-4*. Nat Struct Mol Biol, 2013. **20**(1): p. 67-72.
211. Paal, T., et al., *Probing the spatial organization of measles virus fusion complexes*. J Virol, 2009. **83**(20): p. 10480-93.
212. Tatsuo, H., et al., *SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus*. Nature, 2000. **406**(6798): p. 893-7.

213. Hsu, E.C., et al., *CDw150(SLAM) is a receptor for a lymphotropic strain of measles virus and may account for the immunosuppressive properties of this virus*. Virology, 2001. **279**(1): p. 9-21.
214. de Witte, L., et al., *DC-SIGN and CD150 have distinct roles in transmission of measles virus from dendritic cells to T-lymphocytes*. PLoS Pathog, 2008. **4**(4): p. e1000049.
215. Noyce, R.S. and C.D. Richardson, *Nectin 4 is the epithelial cell receptor for measles virus*. Trends Microbiol, 2012. **20**(9): p. 429-39.
216. Naniche, D., et al., *Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus*. J Virol, 1993. **67**(10): p. 6025-32.
217. Yanagi, Y., et al., *Measles virus receptor SLAM (CD150)*. Virology, 2002. **299**(2): p. 155-61.
218. Liszewski, M.K., T.W. Post, and J.P. Atkinson, *Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 431-55.
219. Iwata, K., et al., *Diversity of sites for measles virus binding and for inactivation of complement C3b and C4b on membrane cofactor protein CD46*. J Biol Chem, 1995. **270**(25): p. 15148-52.
220. Manchester, M., D. Naniche, and T. Stehle, *CD46 as a measles receptor: form follows function*. Virology, 2000. **274**(1): p. 5-10.
221. Karp, C.L., et al., *Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus*. Science, 1996. **273**(5272): p. 228-31.
222. Marie, J.C., et al., *Linking innate and acquired immunity: divergent role of CD46 cytoplasmic domains in T cell induced inflammation*. Nat Immunol, 2002. **3**(7): p. 659-66.
223. Kemper, C., et al., *Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype*. Nature, 2003. **421**(6921): p. 388-92.
224. Katayama, Y., A. Hirano, and T.C. Wong, *Human receptor for measles virus (CD46) enhances nitric oxide production and restricts virus replication in mouse macrophages by modulating production of alpha/beta interferon*. J Virol, 2000. **74**(3): p. 1252-7.
225. Noyce, R.S., et al., *Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus*. PLoS Pathog, 2011. **7**(8): p. e1002240.
226. Muhlebach, M.D., et al., *Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus*. Nature, 2011. **480**(7378): p. 530-3.
227. Lamb, R.A. and T.S. Jardetzky, *Structural basis of viral invasion: lessons from paramyxovirus F*. Curr Opin Struct Biol, 2007. **17**(4): p. 427-36.
228. Cattaneo, R., et al., *Altered transcription of a defective measles virus genome derived from a diseased human brain*. EMBO J, 1987. **6**(3): p. 681-8.
229. Radecke, F. and M.A. Billeter, *Appendix: measles virus antigenome and protein consensus sequences*. Curr Top Microbiol Immunol, 1995. **191**: p. 181-92.
230. Cathomen, T., et al., *A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain*. EMBO J, 1998. **17**(14): p. 3899-908.
231. Harrison, M.S., T. Sakaguchi, and A.P. Schmitt, *Paramyxovirus assembly and budding: building particles that transmit infections*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(9): p. 1416-29.
232. Patterson, J.B., et al., *V and C proteins of measles virus function as virulence factors in vivo*. Virology, 2000. **267**(1): p. 80-9.
233. Cattaneo, R., et al., *Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein*. Cell, 1989. **56**(5): p. 759-64.
234. Bellini, W.J., et al., *Measles virus P gene codes for two proteins*. J Virol, 1985. **53**(3): p. 908-19.
235. Schneider, H., K. Kaelin, and M.A. Billeter, *Recombinant measles viruses defective for RNA editing and V protein synthesis are viable in cultured cells*. Virology, 1997. **227**(2): p. 314-22.

236. Valsamakis, A., et al., *Recombinant measles viruses with mutations in the C, V, or F gene have altered growth phenotypes in vivo*. J Virol, 1998. **72**(10): p. 7754-61.
237. Caignard, G., et al., *Measles virus V protein blocks Jak1-mediated phosphorylation of STAT1 to escape IFN-alpha/beta signaling*. Virology, 2007. **368**(2): p. 351-62.
238. Childs, K., et al., *mda-5, but not RIG-I, is a common target for paramyxovirus V proteins*. Virology, 2007. **359**(1): p. 190-200.
239. Davis, M.E., et al., *Antagonism of the phosphatase PP1 by the measles virus V protein is required for innate immune escape of MDA5*. Cell Host Microbe, 2014. **16**(1): p. 19-30.
240. Wies, E., et al., *Dephosphorylation of the RNA sensors RIG-I and MDA5 by the phosphatase PP1 is essential for innate immune signaling*. Immunity, 2013. **38**(3): p. 437-49.
241. Tober, C., et al., *Expression of measles virus V protein is associated with pathogenicity and control of viral RNA synthesis*. J Virol, 1998. **72**(10): p. 8124-32.
242. Komune, N., et al., *Measles virus V protein inhibits NLRP3 inflammasome-mediated interleukin-1beta secretion*. J Virol, 2011. **85**(24): p. 13019-26.
243. Radecke, F. and M.A. Billeter, *The nonstructural C protein is not essential for multiplication of Edmonston B strain measles virus in cultured cells*. Virology, 1996. **217**(1): p. 418-21.
244. Takeuchi, K., et al., *Stringent requirement for the C protein of wild-type measles virus for growth both in vitro and in macaques*. J Virol, 2005. **79**(12): p. 7838-44.
245. McAllister, C.S., et al., *Mechanisms of protein kinase PKR-mediated amplification of beta interferon induction by C protein-deficient measles virus*. J Virol, 2010. **84**(1): p. 380-6.
246. Sparrer, K.M., C.K. Pfaller, and K.K. Conzelmann, *Measles virus C protein interferes with Beta interferon transcription in the nucleus*. J Virol, 2012. **86**(2): p. 796-805.
247. Toth, A.M., et al., *Protein kinase PKR mediates the apoptosis induction and growth restriction phenotypes of C protein-deficient measles virus*. J Virol, 2009. **83**(2): p. 961-8.
248. Pfaller, C.K., et al., *Measles virus C protein impairs production of defective copyback double-stranded viral RNA and activation of protein kinase R*. J Virol, 2014. **88**(1): p. 456-68.
249. Pfaller, C.K., et al., *Measles Virus Defective Interfering RNAs Are Generated Frequently and Early in the Absence of C Protein and Can Be Destabilized by Adenosine Deaminase Acting on RNA-1-Like Hypermutations*. J Virol, 2015. **89**(15): p. 7735-47.
250. Richetta, C., et al., *Sustained autophagy contributes to measles virus infectivity*. PLoS Pathog, 2013. **9**(9): p. e1003599.
251. Joubert, P.E., et al., *Autophagy induction by the pathogen receptor CD46*. Cell Host Microbe, 2009. **6**(4): p. 354-66.
252. Xia, M., et al., *Mitophagy enhances oncolytic measles virus replication by mitigating DDX58/RIG-I-like receptor signaling*. J Virol, 2014. **88**(9): p. 5152-64.
253. Bellini, W.J. and P.A. Rota, *Genetic diversity of wild-type measles viruses: implications for global measles elimination programs*. Emerg Infect Dis, 1998. **4**(1): p. 29-35.
254. Anderson, B.D., et al., *High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus*. Cancer Res, 2004. **64**(14): p. 4919-26.
255. Fishelson, Z., et al., *Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors*. Mol Immunol, 2003. **40**(2-4): p. 109-23.
256. Achard, C., et al., *Sensitivity of human pleural mesothelioma to oncolytic measles virus depends on defects of the type I interferon response*. Oncotarget, 2015. **6**(42): p. 44892-904.
257. Berchtold, S., et al., *Innate immune defense defines susceptibility of sarcoma cells to measles vaccine virus-based oncolysis*. J Virol, 2013. **87**(6): p. 3484-501.
258. Allagui, F., et al., *Modulation of the Type I Interferon Response Defines the Sensitivity of Human Melanoma Cells to Oncolytic Measles Virus*. Curr Gene Ther, 2017.

259. Msaouel, P., et al., *Oncolytic measles virus strains as novel anticancer agents*. Expert Opin Biol Ther, 2013. **13**(4): p. 483-502.
260. Grote, D., et al., *Live attenuated measles virus induces regression of human lymphoma xenografts in immunodeficient mice*. Blood, 2001. **97**(12): p. 3746-54.
261. Heinzerling, L., et al., *Oncolytic measles virus in cutaneous T-cell lymphomas mounts antitumor immune responses in vivo and targets interferon-resistant tumor cells*. Blood, 2005. **106**(7): p. 2287-94.
262. Peng, K.W., et al., *Intraperitoneal therapy of ovarian cancer using an engineered measles virus*. Cancer Res, 2002. **62**(16): p. 4656-62.
263. Peng, K.W., et al., *Systemic therapy of myeloma xenografts by an attenuated measles virus*. Blood, 2001. **98**(7): p. 2002-7.
264. Allen, C., et al., *Oncolytic measles virus strains have significant antitumor activity against glioma stem cells*. Gene Ther, 2013. **20**(4): p. 444-9.
265. Opyrchal, M., et al., *Effective radiovirotherapy for malignant gliomas by using oncolytic measles virus strains encoding the sodium iodide symporter (MV-NIS)*. Hum Gene Ther, 2012. **23**(4): p. 419-27.
266. Boisgerault, N., et al., *Natural oncolytic activity of live-attenuated measles virus against human lung and colorectal adenocarcinomas*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 387362.
267. Gauthier, A., et al., *Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response*. Cancer Res, 2008. **68**(12): p. 4882-92.
268. Guillerme, J.B., et al., *Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(5): p. 1147-58.
269. Hutzen, B., C. Raffel, and A.W. Studebaker, *Advances in the design and development of oncolytic measles viruses*. Oncolytic Virother, 2015. **4**: p. 109-18.
270. Bucheit, A.D., et al., *An oncolytic measles virus engineered to enter cells through the CD20 antigen*. Mol Ther, 2003. **7**(1): p. 62-72.
271. Hammond, A.L., et al., *Single-chain antibody displayed on a recombinant measles virus confers entry through the tumor-associated carcinoembryonic antigen*. J Virol, 2001. **75**(5): p. 2087-96.
272. Peng, K.W., et al., *Oncolytic measles viruses displaying a single-chain antibody against CD38, a myeloma cell marker*. Blood, 2003. **101**(7): p. 2557-62.
273. Maisner, A., et al., *Recombinant measles virus requiring an exogenous protease for activation of infectivity*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 2): p. 441-9.
274. Muhlebach, M.D., et al., *Liver cancer protease activity profiles support therapeutic options with matrix metalloproteinase-activatable oncolytic measles virus*. Cancer Res, 2010. **70**(19): p. 7620-9.
275. Springfield, C., et al., *Oncolytic efficacy and enhanced safety of measles virus activated by tumor-secreted matrix metalloproteinases*. Cancer Res, 2006. **66**(15): p. 7694-700.
276. Ruiz, A.J. and S.J. Russell, *MicroRNAs and oncolytic viruses*. Curr Opin Virol, 2015. **13**: p. 40-8.
277. Kefas, B., et al., *microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma*. Cancer Res, 2008. **68**(10): p. 3566-72.
278. Leber, M.F., et al., *MicroRNA-sensitive oncolytic measles viruses for cancer-specific vector tropism*. Mol Ther, 2011. **19**(6): p. 1097-106.
279. Peng, K.W., et al., *Non-invasive in vivo monitoring of trackable viruses expressing soluble marker peptides*. Nat Med, 2002. **8**(5): p. 527-31.
280. Allen, C., et al., *Retargeted oncolytic measles strains entering via the EGFRvIII receptor maintain significant antitumor activity against gliomas with increased tumor specificity*. Cancer Res, 2006. **66**(24): p. 11840-50.

281. Dingli, D., et al., *Image-guided radiovirotherapy for multiple myeloma using a recombinant measles virus expressing the thyroidal sodium iodide symporter*. Blood, 2004. **103**(5): p. 1641-6.
282. Hutzen, B., et al., *Treatment of medulloblastoma using an oncolytic measles virus encoding the thyroidal sodium iodide symporter shows enhanced efficacy with radioiodine*. BMC Cancer, 2012. **12**: p. 508.
283. Msaouel, P., et al., *Noninvasive imaging and radiovirotherapy of prostate cancer using an oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter*. Mol Ther, 2009. **17**(12): p. 2041-8.
284. Ungerechts, G., et al., *Lymphoma chemovirotherapy: CD20-targeted and convertase-armed measles virus can synergize with fludarabine*. Cancer Res, 2007. **67**(22): p. 10939-47.
285. Ungerechts, G., et al., *An immunocompetent murine model for oncolysis with an armed and targeted measles virus*. Mol Ther, 2007. **15**(11): p. 1991-7.
286. Lampe, J., et al., *An armed oncolytic measles vaccine virus eliminates human hepatoma cells independently of apoptosis*. Gene Ther, 2013. **20**(11): p. 1033-41.
287. Kaufmann, J.K., et al., *Chemovirotherapy of malignant melanoma with a targeted and armed oncolytic measles virus*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(4): p. 1034-42.
288. Hartkopf, A.D., et al., *Enhanced killing of ovarian carcinoma using oncolytic measles vaccine virus armed with a yeast cytosine deaminase and uracil phosphoribosyltransferase*. Gynecol Oncol, 2013. **130**(2): p. 362-8.
289. Lange, S., et al., *A novel armed oncolytic measles vaccine virus for the treatment of cholangiocarcinoma*. Hum Gene Ther, 2013. **24**(5): p. 554-64.
290. Grossardt, C., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-armed oncolytic measles virus is an effective therapeutic cancer vaccine*. Hum Gene Ther, 2013. **24**(7): p. 644-54.
291. Li, H., et al., *Oncolytic measles viruses encoding interferon beta and the thyroidal sodium iodide symporter gene for mesothelioma virotherapy*. Cancer Gene Ther, 2010. **17**(8): p. 550-8.
292. Iankov, I.D., et al., *Expression of immunomodulatory neutrophil-activating protein of Helicobacter pylori enhances the antitumor activity of oncolytic measles virus*. Mol Ther, 2012. **20**(6): p. 1139-47.
293. Boutros, C., et al., *Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination*. Nat Rev Clin Oncol, 2016. **13**(8): p. 473-86.
294. Engeland, C.E., et al., *CTLA-4 and PD-L1 checkpoint blockade enhances oncolytic measles virus therapy*. Mol Ther, 2014. **22**(11): p. 1949-59.
295. Derycke, M.S., et al., *Nectin 4 overexpression in ovarian cancer tissues and serum: potential role as a serum biomarker*. Am J Clin Pathol, 2010. **134**(5): p. 835-45.
296. Galanis, E., et al., *Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer*. Cancer Res, 2010. **70**(3): p. 875-82.
297. Galanis, E., et al., *Oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter to treat drug-resistant ovarian cancer*. Cancer Res, 2015. **75**(1): p. 22-30.
298. Russell, S.J., et al., *Remission of disseminated cancer after systemic oncolytic virotherapy*. Mayo Clin Proc, 2014. **89**(7): p. 926-33.
299. Nakamura, T., et al., *Rescue and propagation of fully retargeted oncolytic measles viruses*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(2): p. 209-14.
300. Boisgerault, N., F. Tangy, and M. Gregoire, *New perspectives in cancer virotherapy: bringing the immune system into play*. Immunotherapy, 2010. **2**(2): p. 185-99.
301. Errington, F., et al., *Reovirus activates human dendritic cells to promote innate antitumor immunity*. J Immunol, 2008. **180**(9): p. 6018-26.

302. Andrejeva, J., 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, 2004. **101**(49): p. 17264-9.
303. Yoneyama, M., et al., *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(7): p. 730-7.
304. Feng, Q., et al., *MDA5 detects the double-stranded RNA replicative form in picornavirus-infected cells*. Cell Rep, 2012. **2**(5): p. 1187-96.
305. Pichlmair, A., et al., *Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection*. J Virol, 2009. **83**(20): p. 10761-9.
306. Goubau, D., S. Deddouche, and C. Reis e Sousa, *Cytosolic sensing of viruses*. Immunity, 2013. **38**(5): p. 855-69.
307. Schneider, W.M., M.D. Chevillotte, and C.M. Rice, *Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses*. Annu Rev Immunol, 2014. **32**: p. 513-45.
308. Elde, N.C., et al., *Protein kinase R reveals an evolutionary model for defeating viral mimicry*. Nature, 2009. **457**(7228): p. 485-9.
309. Peng, K.W., et al., *Using clinically approved cyclophosphamide regimens to control the humoral immune response to oncolytic viruses*. Gene Ther, 2013. **20**(3): p. 255-61.
310. Sistigu, A., et al., *Immunomodulatory effects of cyclophosphamide and implementations for vaccine design*. Semin Immunopathol, 2011. **33**(4): p. 369-83.
311. ClinicalTrials.gov. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02192775>.
312. Najar, M., et al., *Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells*. Cytotherapy, 2016. **18**(2): p. 160-71.
313. Castleton, A., et al., *Human mesenchymal stromal cells deliver systemic oncolytic measles virus to treat acute lymphoblastic leukemia in the presence of humoral immunity*. Blood, 2014. **123**(9): p. 1327-35.
314. Ong, H.T., et al., *Systemically delivered measles virus-infected mesenchymal stem cells can evade host immunity to inhibit liver cancer growth*. J Hepatol, 2013. **59**(5): p. 999-1006.
315. Mader, E.K., et al., *Mesenchymal stem cell carriers protect oncolytic measles viruses from antibody neutralization in an orthotopic ovarian cancer therapy model*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(23): p. 7246-55.
316. Qiao, J., et al., *Purging metastases in lymphoid organs using a combination of antigen-nonspecific adoptive T cell therapy, oncolytic virotherapy and immunotherapy*. Nat Med, 2008. **14**(1): p. 37-44.
317. Cogulu, D., et al., *Associations of interleukin (IL)-1beta, IL-1 receptor antagonist, and IL-10 with dental caries*. J Oral Sci, 2015. **57**(1): p. 31-6.
318. Inoue, H. and K. Tani, *Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments*. Cell Death Differ, 2014. **21**(1): p. 39-49.
319. Cirone, M., et al., *Activation of dendritic cells by tumor cell death*. Oncoimmunology, 2012. **1**(7): p. 1218-1219.
320. Ahn, S.G., et al., *Current Issues and Clinical Evidence in Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer*. J Pathol Transl Med, 2015. **49**(5): p. 355-63.
321. Galon, J., et al., *Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome*. Science, 2006. **313**(5795): p. 1960-4.
322. Mihm, M.C., Jr., C.G. Clemente, and N. Cascinelli, *Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response*. Lab Invest, 1996. **74**(1): p. 43-7.

323. Nakano, O., et al., *Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity.* Cancer Res, 2001. **61**(13): p. 5132-6.
324. Zhang, L., et al., *Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer.* N Engl J Med, 2003. **348**(3): p. 203-13.
325. Sato, E., et al., *Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(51): p. 18538-43.
326. Garrido, F., et al., *The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy.* Curr Opin Immunol, 2016. **39**: p. 44-51.
327. Grote, D., R. Cattaneo, and A.K. Fielding, *Neutrophils contribute to the measles virus-induced antitumor effect: enhancement by granulocyte macrophage colony-stimulating factor expression.* Cancer Res, 2003. **63**(19): p. 6463-8.
328. Donnelly, O.G., et al., *Measles virus causes immunogenic cell death in human melanoma.* Gene Ther, 2013. **20**(1): p. 7-15.
329. Fonteneau, J.F., et al., *Attenuated measles virus used as an oncolytic virus activates myeloid and plasmacytoid dendritic cells.* Oncoimmunology, 2013. **2**(5): p. e24212.
330. Pinton, G., et al., *Therapies currently in Phase II trials for malignant pleural mesothelioma.* Expert Opin Investig Drugs, 2013. **22**(10): p. 1255-63.
331. Fonteneau, J.F., et al., *Oncolytic immunotherapy: The new clinical outbreak.* Oncoimmunology, 2016. **5**(1): p. e1066961.
332. Roulois, D., et al., *Characterization of preneoplastic and neoplastic rat mesothelial cell lines: the involvement of TETs, DNMTs, and 5-hydroxymethylcytosine.* Oncotarget, 2016.
333. Song, L., et al., *Galectin-3 in cancer.* Clin Chim Acta, 2014. **431**: p. 185-91.
334. Bergamaschi, A., et al., *Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome.* J Pathol, 2008. **214**(3): p. 357-67.
335. Chen, H., W. Jia, and J. Li, *ECM1 promotes migration and invasion of hepatocellular carcinoma by inducing epithelial-mesenchymal transition.* World J Surg Oncol, 2016. **14**(1): p. 195.
336. Jia, Y., et al., *Overexpression of IFITM3 predicts poor prognosis in stage IIA esophageal squamous cell carcinoma after Ivor Lewis esophagectomy.* Thorac Cancer, 2017.
337. Lal, G., et al., *Extracellular matrix 1 (ECM1) expression is a novel prognostic marker for poor long-term survival in breast cancer: a Hospital-based Cohort Study in Iowa.* Ann Surg Oncol, 2009. **16**(8): p. 2280-7.
338. Mondal, B., et al., *Integrative functional genomic analysis identifies epigenetically regulated fibromodulin as an essential gene for glioma cell migration.* Oncogene, 2017. **36**(1): p. 71-83.
339. Rolih, V., et al., *CSPG4: a prototype oncoantigen for translational immunotherapy studies.* J Transl Med, 2017. **15**(1): p. 151.
340. Yang, M., et al., *Knockdown of interferon-induced transmembrane protein 3 expression suppresses breast cancer cell growth and colony formation and affects the cell cycle.* Oncol Rep, 2013. **30**(1): p. 171-8.
341. Fukuhara, H., Y. Ino, and T. Todo, *Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn.* Cancer Sci, 2016. **107**(10): p. 1373-1379.
342. Dispenzieri, A., et al., *Phase I trial of systemic administration of Edmonston strain of measles virus genetically engineered to express the sodium iodide symporter in patients with recurrent or refractory multiple myeloma.* Leukemia, 2017.
343. Msaouel, P., et al., *Clinical Trials with Oncolytic Measles Virus: Current Status and Future Prospects.* Curr Cancer Drug Targets, 2017.

344. Ivashkiv, L.B. and L.T. Donlin, *Regulation of type I interferon responses*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(1): p. 36-49.
345. Nakatsu, Y., et al., *Measles virus circumvents the host interferon response by different actions of the C and V proteins*. J Virol, 2008. **82**(17): p. 8296-306.
346. Kepp, O., et al., *Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death*. Oncoimmunology, 2014. **3**(9): p. e955691.
347. Kelly, K.J., et al., *Novel oncolytic agent GLV-1h68 is effective against malignant pleural mesothelioma*. Hum Gene Ther, 2008. **19**(8): p. 774-82.
348. Waibler, Z., et al., *Vaccinia virus-mediated inhibition of type I interferon responses is a multifactorial process involving the soluble type I interferon receptor B18 and intracellular components*. J Virol, 2009. **83**(4): p. 1563-71.
349. Bowie, A., et al., *A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(18): p. 10162-7.
350. Fend, L., et al., *Immune Checkpoint Blockade, Immunogenic Chemotherapy or IFN-alpha Blockade Boost the Local and Abscopal Effects of Oncolytic Virotherapy*. Cancer Res, 2017. **77**(15): p. 4146-4157.
351. Kretzschmar, M., et al., *Frequency of adverse events after vaccination with different vaccinia strains*. PLoS Med, 2006. **3**(8): p. e272.
352. Heinrich, B., et al., *Immunogenicity of oncolytic vaccinia viruses JX-GFP and TG6002 in a human melanoma in vitro model: studying immunogenic cell death, dendritic cell maturation and interaction with cytotoxic T lymphocytes*. Onco Targets Ther, 2017. **10**: p. 2389-2401.

ANNEXES

Annexe n°1 : Characterization of preneoplastic and neoplastic rat mesothelial cell lines: the involvement of TETs, DNMTs, and 5-hydroxymethylcytosine

David Roulois, Sophie Deshayes, Marie-Noëlle Guilly, Joëlle S. Nader, Charly Liddell, Myriam Robard, Philippe Hulin, Amal Ouacher, Vanessa Le Martelot, Jean-François Fonteneau, Marc Grégoire, Christophe Blanquart *, Daniel L. Pouliquen *

Le mésothéliome malin (MM) est l'un des pires cancers en termes de résultats cliniques puisqu'à ce jour aucun progrès sensible n'a été obtenu pour son traitement. Il est donc urgent d'établir et de caractériser de nouveaux outils précliniques pour l'investigation des processus de tumorigenèse, pour l'amélioration du diagnostic précoce et pour l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Pour cela, nous caractérisons dans cet article une biocollection, créée par notre équipe, de 27 lignées cellulaires de MM établies chez des rats Fisher F344 exposés à des fibres d'amiante administrées par voie péritonéale. Quatre lignées de MM se distinguent de 23 lignées pré-néoplasiques (PN) par leur propension à générer des tumeurs après transplantation orthotopique chez des rats syngéniques, par leur profil de croissance et par l'expression de différents gènes. Suite à des analyses d'expression et de morphologie en culture, nous avons pu classer les lignées PN en sous-groupes. Les 4 lignées tumorales, quant à elles, nous ont servi pour une étude comparative avec des lignées de MM humains, les lignées PN et des cellules mésothéliales humaines saines dans le but de trouver des biomarqueurs éventuels pour le MM. Nos résultats montrent que les lignées MM de rat et humaines partagent une diminution spectaculaire de l'expression relative de *Cdkn2a* (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A), et des régulateurs épigénétiques par rapport aux PN et aux cellules mésothéliales humaines normales.

En conclusion, cette étude nous a permis de caractériser une nouvelle collection de mésothéliomes néoplasiques et préneoplasiques et d'identifier de nouveaux gènes, exprimés à la fois chez le rat et le MM humain, jouant un rôle dans le contexte de la transformation maligne et de l'acquisition du potentiel métastatique.

Characterization of preneoplastic and neoplastic rat mesothelial cell lines: the involvement of TETs, DNMTs, and 5-hydroxymethylcytosine

David Roulois^{1,2,3}, Sophie Deshayes^{1,2,3}, Marie-Noëlle Guilly⁴, Joëlle S. Nader^{1,2,3}, Charly Liddell^{1,2,3}, Myriam Robard^{2,5}, Philippe Hulin^{2,5}, Amal Ouacher^{1,2,3}, Vanessa Le Martelot^{1,2,3}, Jean-François Fonteneau^{1,2,3}, Marc Grégoire^{1,2,3}, Christophe Blanquart^{1,2,3,*}, Daniel L. Pouliquen^{1,2,3,*}

¹CRCNA, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France

²INSERM, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France

³CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France

⁴CEA, DSV, IRCM, LCE, BP6, Fontenay aux Roses cedex, France

⁵Cellular and Tissular Imaging Core Facility (MicroPICell), Nantes, France

*These authors contributed equally to this work

Correspondence to: Daniel L. Pouliquen, e-mail: daniel.pouliquen@inserm.fr

Keywords: mesothelioma, preneoplastic mesothelial cells, rat, TETs, DNMTs

Received: September 04, 2015

Accepted: April 10, 2016

Published: April 25, 2016

ABSTRACT

Malignant mesothelioma (MM) is one of the worst cancers in terms of clinical outcome, urging the need to establish and characterize new preclinical tools for investigation of the tumorigenic process, improvement of early diagnosis and evaluation of new therapeutic strategies. For these purposes, we characterized a collection of 27 cell lines established from F344 rats, after 136 to 415 days of induction with crocidolite asbestos administered intraperitoneally. Four mesotheliomas were distinguished from 23 preneoplastic mesothelial cell lines (PN) according to their propensity to generate tumors after orthotopic transplantation into syngeneic rats, their growth pattern, and the expression profile of three genes. PN cell lines were further discriminated into groups / subgroups according to morphology in culture and the expression profiles of 14 additional genes. This approach was completed by analysis of positive and negative immunohistochemical MM markers in the four tumors, of karyotype alterations in the most aggressive MM cell line in comparison with a PN epithelioid cell line, and of human normal mesothelial and mesothelioma cells and a tissue array. Our results showed that both the rat and human MM cell lines shared in common a dramatic decrease in the relative expression of *Cdkn2a* and of epigenetic regulators, in comparison with PN and normal human mesothelial cells, respectively. In particular, we identified the involvement of the relative expression of the Ten-Eleven Translocation (*TET*) family of dioxygenases and *Dnmt3a* in relation to the 5-hydroxymethylcytosine level in malignant transformation and the acquisition of metastatic potential.

INTRODUCTION

Malignant mesothelioma (MM) is a rare, aggressive cancer mainly related to asbestos exposure [1], the long latency time between exposure and occurrence of clinical symptoms limiting the efficacy of therapeutic

interventions. Given its chemoresistance, current therapies have a negligible impact on overall survival due to a lack of understanding of the complex biology of MM [2]. Thus, a better understanding of the different steps in the development of this disease should be of great interest for the identification of early markers of MM

and of other potential therapeutic targets. In addition, to improve the evaluation of new therapeutic strategies, well-characterized and highly relevant preclinical MM models are urgently required.

Cell lines are universal model systems in cancer research and their characterization has provided crucial insights into the mechanisms leading to malignant transformation. Nevertheless, only a small number of cell lines meet the minimum standards of authentication and characterization [3], emphasizing the need to avoid the use of cultures at high passage levels [4]. Preneoplastic cells represent crucial elements in understanding the timing and sequence of events that lead to neoplastic transformation. Downregulation of E-cadherin was observed in the preneoplastic lesions of a rat model of lung carcinogenesis, which preceded the occurrence of the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) [5], a key feature of the process of evading growth suppressors. Among the new hallmarks identified during the last decade [6], deregulation of cellular energetics, such as local hyperinsulinism, has also been identified to lead to the development of preneoplastic lesions [7], while other reports have demonstrated links between glucose metabolism and epigenetic regulator function [8].

The last decade has also been characterized by a considerable improvement in our understanding of the consequences of epigenomic disruption on the genesis of cancer [9]. Among the multiple epigenetic regulators associated with gene repression, the Ten-Eleven Translocation (TET) family of dioxygenases, which catalyze the conversion of 5-methylcytosine (mC) to 5-hydroxymethylcytosine (hmC), have received much attention. hmC levels were also found to be remarkably depleted in different human cancer tissues relative to their normal counterparts [10], while TET1 was downregulated [11]. Recent reports have suggested that TET2 could be the major function affected in myeloid disorders and that loss of TET2 catalytic function might promote leukemogenesis [12]. To date, all studies investigating hmC levels and/or *TET* expression have systematically compared tumor tissues from various origins relative to their normal counterparts. In all cases, the reduced levels of hmC in tumor tissues were associated with a decrease in the relative expression of all three *TET* genes when compared with their matched normal tissues [13]. To shed light on the earlier stages of carcinogenesis, a pioneering study demonstrated a significant correlation between changes in the three epigenetic components in a rat model of estrogen-induced breast carcinogenesis [14]. Subsequently, the role of polycomb proteins as epigenetic silencers was shown in preneoplastic states in the pancreas of mice and rats [15], while other epigenetic alterations were documented during early stages of hepatocarcinogenesis in rats [16].

To date, the exploration of epigenetic changes, and their connection with other molecular events associated with the different steps from early preneoplastic lesions to

malignant transformation and the acquisition of invasive properties, have not as yet been documented. In this study, the experimental approach used was based on, firstly, the characterization of a new collection of both neoplastic and preneoplastic mesothelial cells, established from an inbred strain of rats induced with asbestos, representing different stages in the tumorigenesis process. Secondly, among the preneoplastic cell lines, different groups and subgroups were identified according to the expression profiles of markers. This approach specifically revealed new findings related to the involvement of the relative expression of *TETs* and *Dnmts* in relation to the 5-hmC level, in the context of malignant transformation and the acquisition of metastatic potential, both in rat and human mesothelioma cells.

RESULTS

Rat mesothelial cell lines can be distinguished in two main categories: preneoplastic and neoplastic

Cell lines were initially distinguished as preneoplastic ("PN", n = 23) or neoplastic ("N", n = 4) according to: observations at necropsy on the individual rats from which each cell line was established, cell morphology in culture, and propensity or not to produce tumors 2 months after orthotopic transplantation of 5×10^6 cells to syngeneic rats (Figure 1A). This discrimination was further confirmed by the analysis of expression profiles, growth patterns, and determination of the levels of cytosine methylation and hydroxymethylation. Analysis of *Cdkn2a* gene mRNA levels by qRT PCR revealed a significantly decreased relative expression in neoplastic relative to preneoplastic rat cell lines (Figure 2A, left). In human cell lines, the expression of *Cdkn2a* was also considerably decreased in pleural mesothelioma (MPM) relative to normal mesothelial cells (MC) (Figure 2A, right). A very significant decrease in the relative expression of *Smad3* and increase in the relative expression of *Lgals3* was also observed in neoplastic relative to preneoplastic rat cell lines (Figures 2B and 2C). Overall, compared with preneoplastic cell lines, neoplastic cells lines were characterized by a shorter mean doubling time (Figure 2D and Table S1), a higher proportion of cells in S phase (Figure 2E) and a higher saturation density (Figure 2F and Table S1). Cell migration analysis by scratching test did not reveal any difference between categories and groups of cell lines (Figure S1). As many solid malignant tumors show a dramatic decrease in their DNA methylation level relative to normal tissues, we analysed by dot blot the global methylation level in the two categories of cell lines and found that the level of cytosine methylation did not differ significantly between preneoplastic and neoplastic cell lines (Figure 2G). However, a very significant difference in the level

of hydroxymethylation was observed, revealing an implication of this parameter during the tumorigenic process (Figure 2H).

Among preneoplastic cell lines, two main groups were identified according to the expression profiles of eight genes and cell morphology in culture

The 23 preneoplastic cell lines comprised two main groups, differing in their general “epithelioid” (named PN-[Epith]) and “sarcomatoid” (named PNsarc) morphology in culture (Figure S2). This observation was associated with differences in the expression profiles of 8 genes (Figure 3A). Analysis of mRNA levels revealed a highly significant decreased expression of genes coding for podoplanin, ezrin, mesothelin, and Hmgb1 (Figures 3A, 3B), and increased expression of genes coding for Rassf1a and Zeb1 in the PNsarc group relative to the PN-[Epith] group (Figure 3A, 3C). These two main groups also differed by a significant increase and decrease in the relative expression of the genes coding for vimentin and WT-1, respectively (Figure 3D). The identification of the PNsarc group of 9 cell lines was confirmed by an increased expression of genes coding for the mesenchymal marker alpha smooth muscle actin (α -SMA), and TGF β , an inducer of the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), relative to the 10 cell lines of the PN-[Epith] group (Figure 4). Finally, a third group of 4 cell lines, which shared with PNsarc a low and high mean mRNA level for the genes coding for podoplanin and Rassf1a, respectively, presented intermediate expression levels for other genes (Figures 3A–3D). This group was also characterized by an important dispersion of mRNA levels for the ten genes evaluated, relative to the PNsarc group, and very different morphological characteristics in culture. For

all these reasons, this group was defined as “miscellaneous” (named PNmisc).

Among the preneoplastic cell lines with epithelioid morphology, three subgroups were identified according to the expression profiles of four additional genes

Among the preneoplastic cell lines with epithelial morphology, a first subgroup (named subnormal, “Subnl”) was identified by the highest expression of *c-Myc*, a proto-oncogene gene the deregulation of which contributes to deregulated DNA synthesis and genomic instability, and the lowest expression of *Igf1*, a gene involved in the deregulation of cellular energetics (Figure 4A). A second subgroup of cell lines (named PNep) differed from the former by a dramatic increase in the expression of *Igf1* and *Il10*, coding for an anti-inflammatory cytokine, and a reduction in the mean expression of *Cdh1*, coding for the epithelial marker, E-cadherin (Figure 4B). Finally, a third subgroup of two cell lines, named PNint, represented an intermediate situation between the PNep and PNsarc subgroups, based on the relative expression of *Cdh1*, *Acta2* and *Tgfb1* (Figure 4B).

Characterization of the neoplastic cell lines and tumors

The four different neoplastic cell lines shared in common a significant decrease in the expression of *Ezr* and *Hmgb1*, compared with the PN-[Epith] group of preneoplastic cell lines, however their expression profile was comparable to that of the PNsarc group (Table S2). Among the four neoplastic cell lines, three, F4-T2, F5-T1 and M5-T1 differed by a lower expression of *Cdkn2a*, *Rassf1* and *wt1*, and a higher expression of *Msln*, *Pdpr*,

ESTABLISHMENT OF CELL LINES

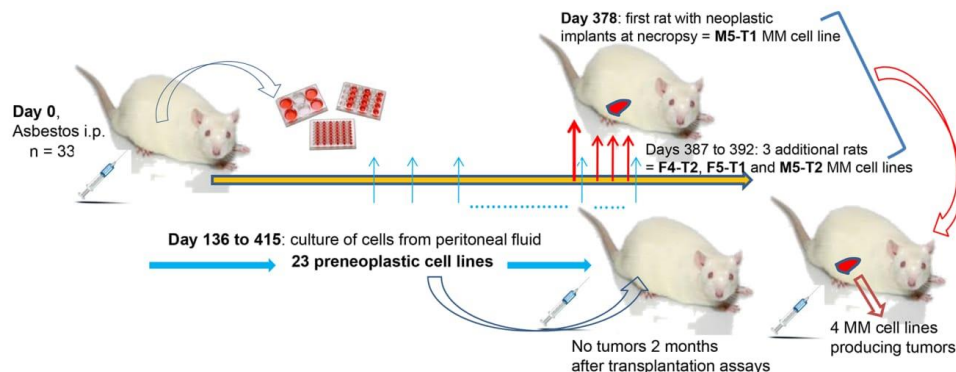


Figure 1: Establishment of the preneoplastic and neoplastic cell lines in F344 rats. Scheme of establishment of the 27 cell lines and the four preclinical MM models.

Acta2, *Zeb1* and *Tgfb1*, compared with M5-T2, (Table S2), and a propensity to produce metastases in different normal tissues after orthotopic transplantation into syngeneic rats. The M5-T2 tumor differed from the three others by the absence of metastatic potential, with tumor cell development restricted to the omentum. *In vitro*, the M5-T2 cell line was also characterized by a low saturation density (Table S1). In contrast, the most aggressive neoplastic cell line, M5-T1, presented a specific growth pattern, characterized by the shortest doubling time,

and the highest saturation density (Table S1). Cell cycle analyses revealed that this cell line showed the highest percentage of cells in S phase, the presence of a tetraploid population, and sphere forming capacity in culture (Figure S3). These observations contrasted with the proportion of cells in the different phases in the diploid F3-1 cell line, chosen as representative of the PNep subgroup of preneoplastic cell lines.

Characterization of the four tumor models by immunohistochemical markers revealed that, although

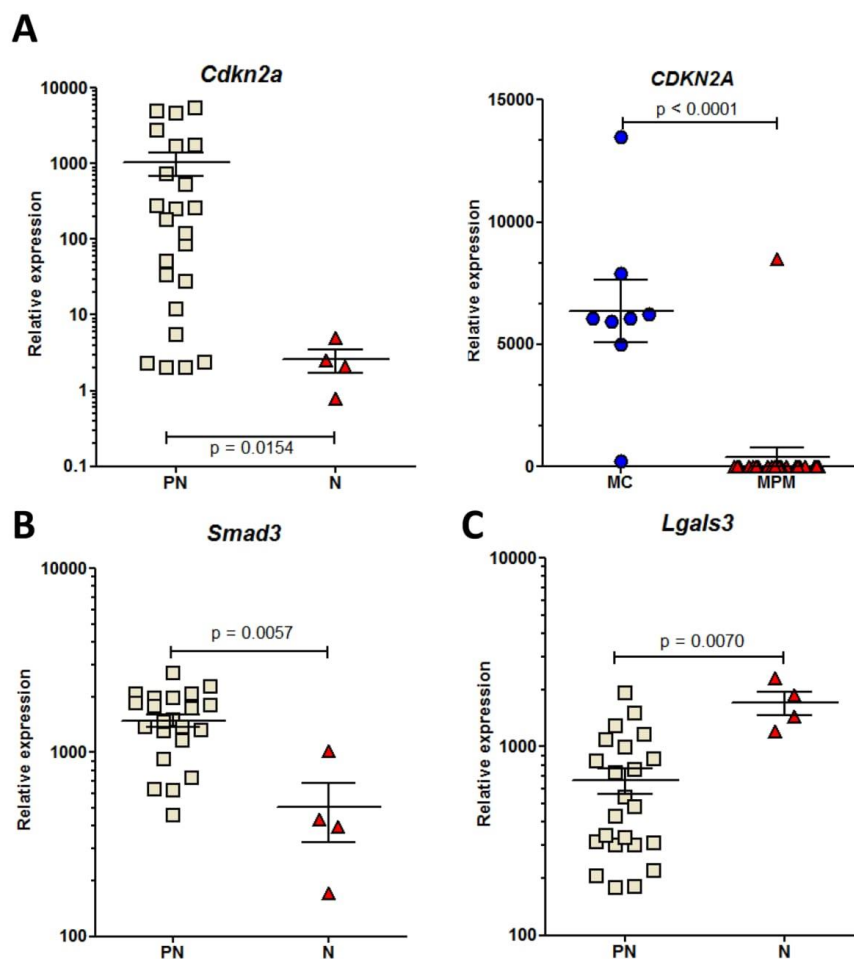


Figure 2: RT-PCR analysis of the relative expression of genes discriminating preneoplastic and neoplastic rat mesothelial cell lines. A. *Cdkn2a* (*p 16*), in the rat experimental biocollection of cell lines (left) and the human biocollection of cell lines (right). MC, normal mesothelial cells; MPM, malignant pleural mesothelioma cells. B. *Smad3* and C. *Lgals3*.

(Continued)

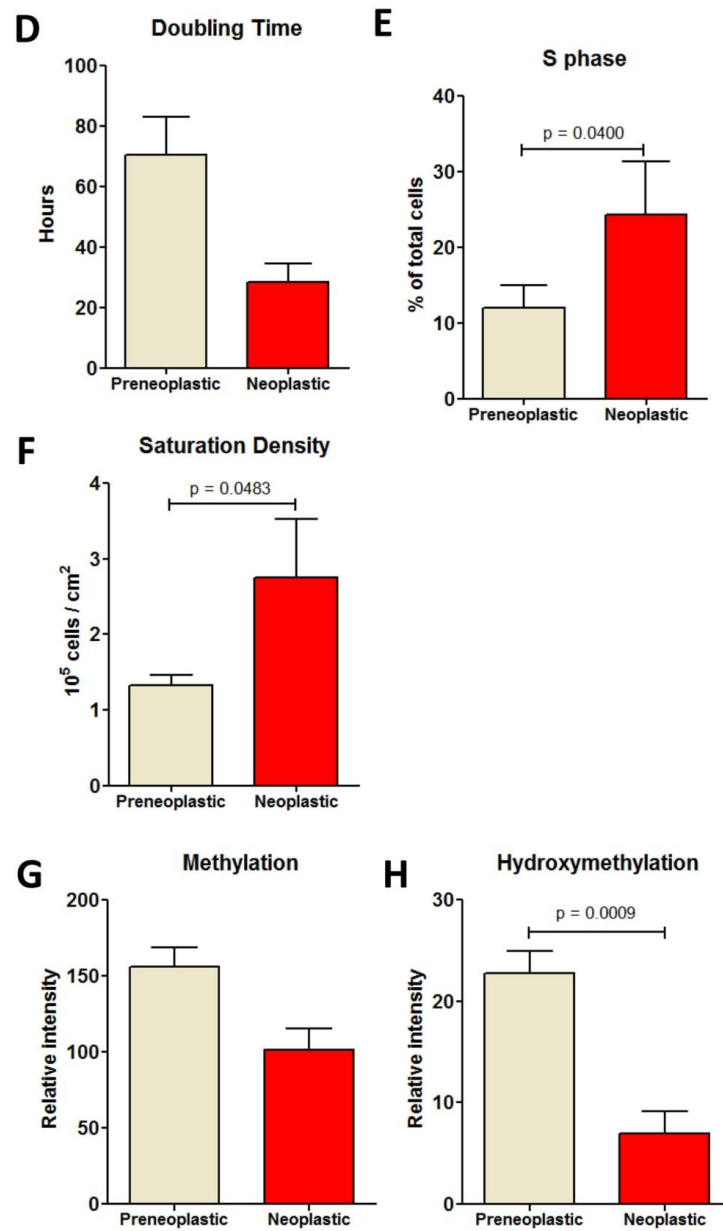


Figure 2 (Continued): Growth characteristics of the rat cell lines in culture, mean doubling time **D**, proportion of cells in S phase **E**, and mean saturation density **F**. Levels of methylation **G**, and hydroxymethylation **H**, determined by dot blot. Signals were quantified for each subgroup of cell lines and normalized to the intensity of the corresponding gel red signal.

the staining was moderate and heterogeneous, all tumor cells exhibited positivity for WT1, a common positive mesothelioma marker (Figure 5A). On the other hand, all tumor cells were negative for ESA/EPCAM/(MOC 31) (Figure 5B), a negative mesothelioma marker commonly used to distinguish mesotheliomas from carcinomas. Comparison between immunostaining for calretinin and vimentin in a liver metastasis of M5-T1, the most aggressive tumor, revealed a contrast between a moderate, overall homogeneous positivity of tumor cells for calretinin, and the presence of foci of cells strongly positive for vimentin close to the tumor front (Figure 5C).

To characterize the chromosomal events potentially associated with the molecular changes, complete spectral karyotypes and karyotypic formulas were analyzed for M5-T1 in comparison with the F3-1 cell line (Figure S4 and Table S3). The unique structural rearrangement

observed in the F3-1 cell line was a der(15)t(1;15) (q?41 ;q2?2), leading to a distal gain of chromosome 1 in 15% of metaphases (Figure S4A, D). Fifty-nine percent of F3-1 metaphases displayed a normal karyotype (42, XX) and 21% of metaphases had a modal chromosome number of 41. Compared with the F3-1 cell line, the study of ploidy in M5-T1 cells revealed the presence of two subpopulations in accordance with cell cycle analysis by flow cytometry (Figure S3). A near-diploid population representing about 61% of the total metaphases analyzed had a modal chromosome number of 43. The tetraploid population represented about 39% of the total metaphases and had a modal chromosome number of 86. The M5-T1 near-diploid population retained the structural abnormality der(15)t(1;15) in two metaphases only, but, interestingly, chromosome 15 was also found to be fused to chromosome 2, and once with chromosome

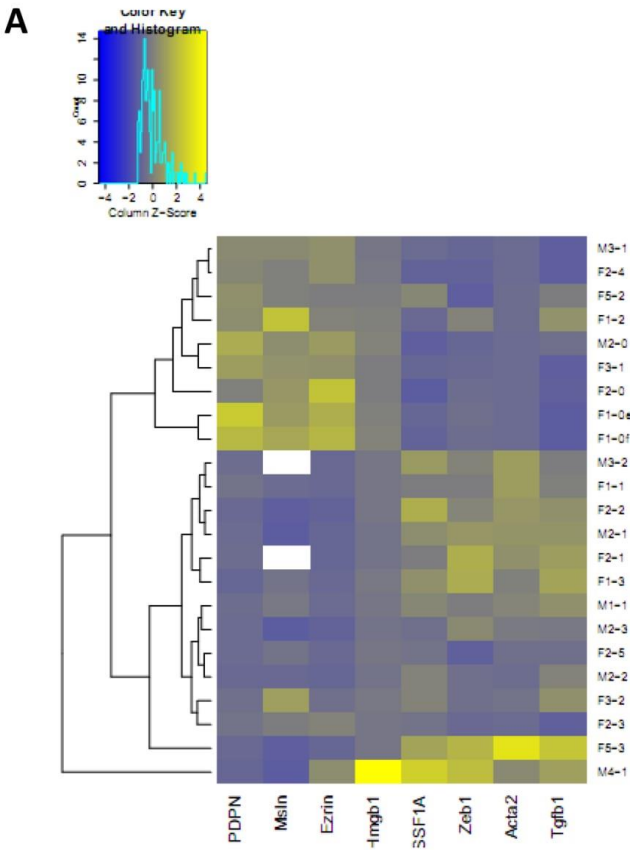


Figure 3: RT-PCR analysis of the expression of genes discriminating the different groups of preneoplastic rat mesothelial cell lines. A. Heatmap of expression profiles of the preneoplastic rat cell lines.

(Continued)

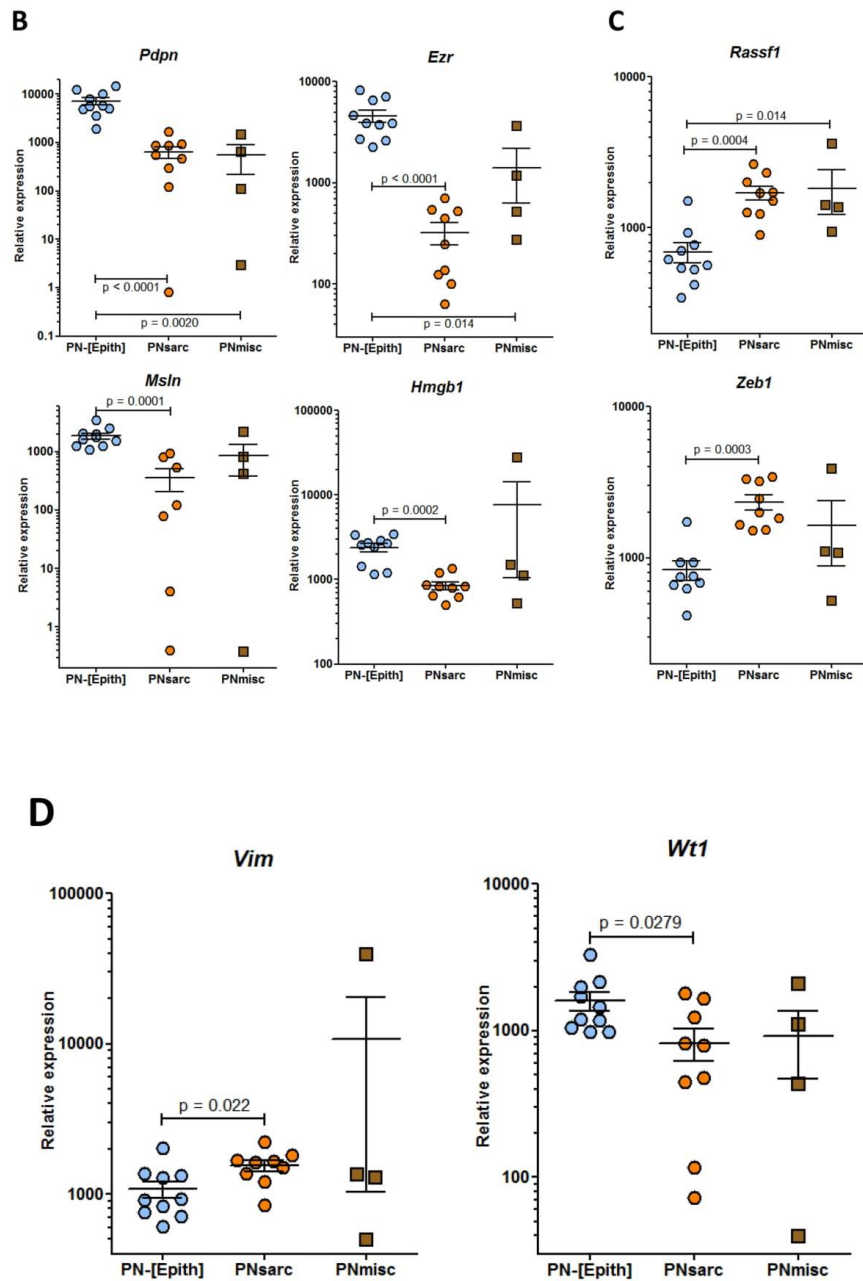


Figure 3 (Continued): Genes coding for **B.** podoplanin (*Pdpn*), ezrin (*Ezr*), mesothelin (*Msln*), HMGB1 (*Hmgb1*); **C.** RASSF1A (*Rassf1*), ZEB1 (*Zeb1*); **D.** vimentin (*Vim*), and WT1 (*Wt1*).

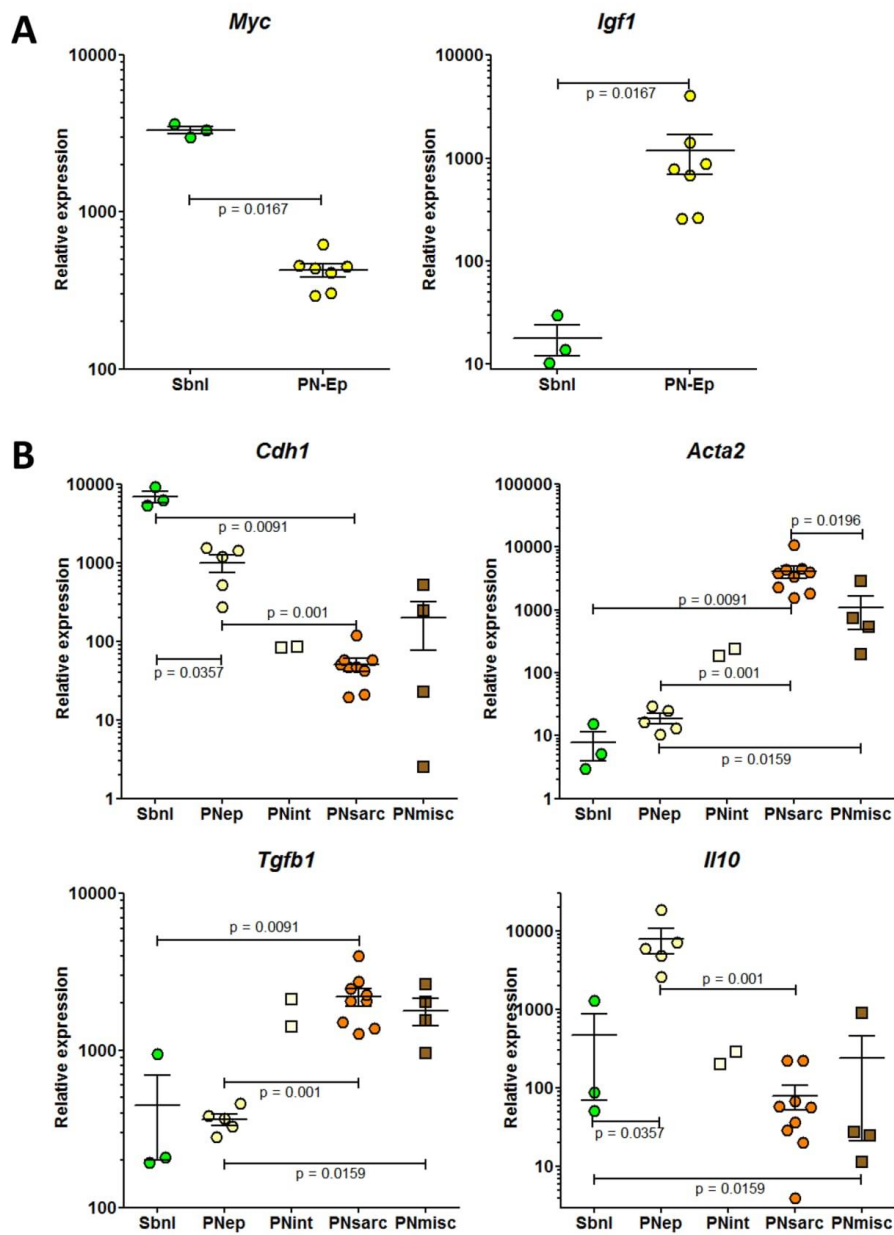


Figure 4: RT-PCR analysis of the expression of genes discriminating the different subgroups of epithelioid preneoplastic rat mesothelial cell lines. Genes coding for A. c-Myc (*Myc*) and IGF-1 (*Igf1*); B. E-cadherin (*Cdh1*), α -smooth muscle actin (α -SMA) (*Acta2*), TGF β (*Tgfb1*), and IL-10 (*Il10*).

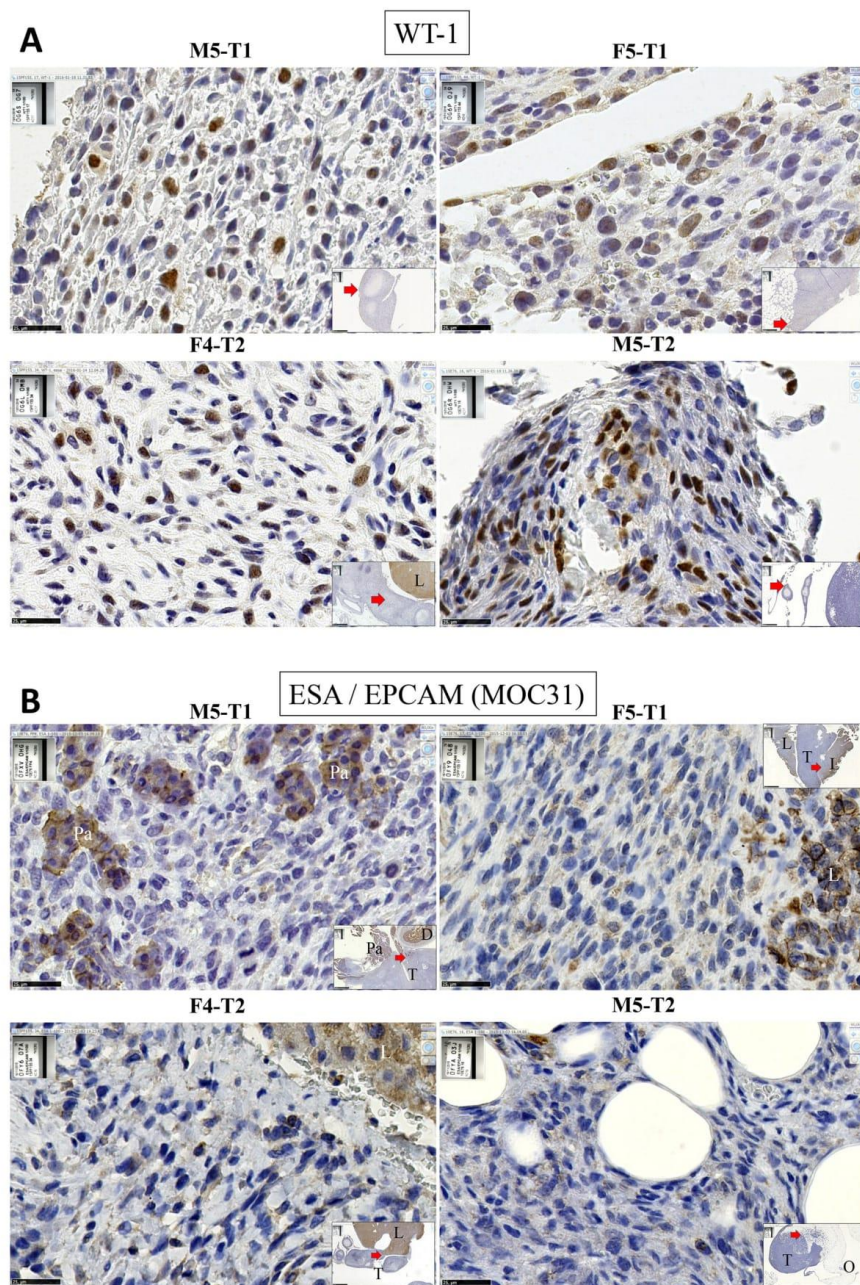


Figure 5: Immunohistochemical characterization of rat mesotheliomas. Immunohistochemical staining for **A.** WT1; **B.** ESA/ EPCAM (MOC 31);

(Continued)

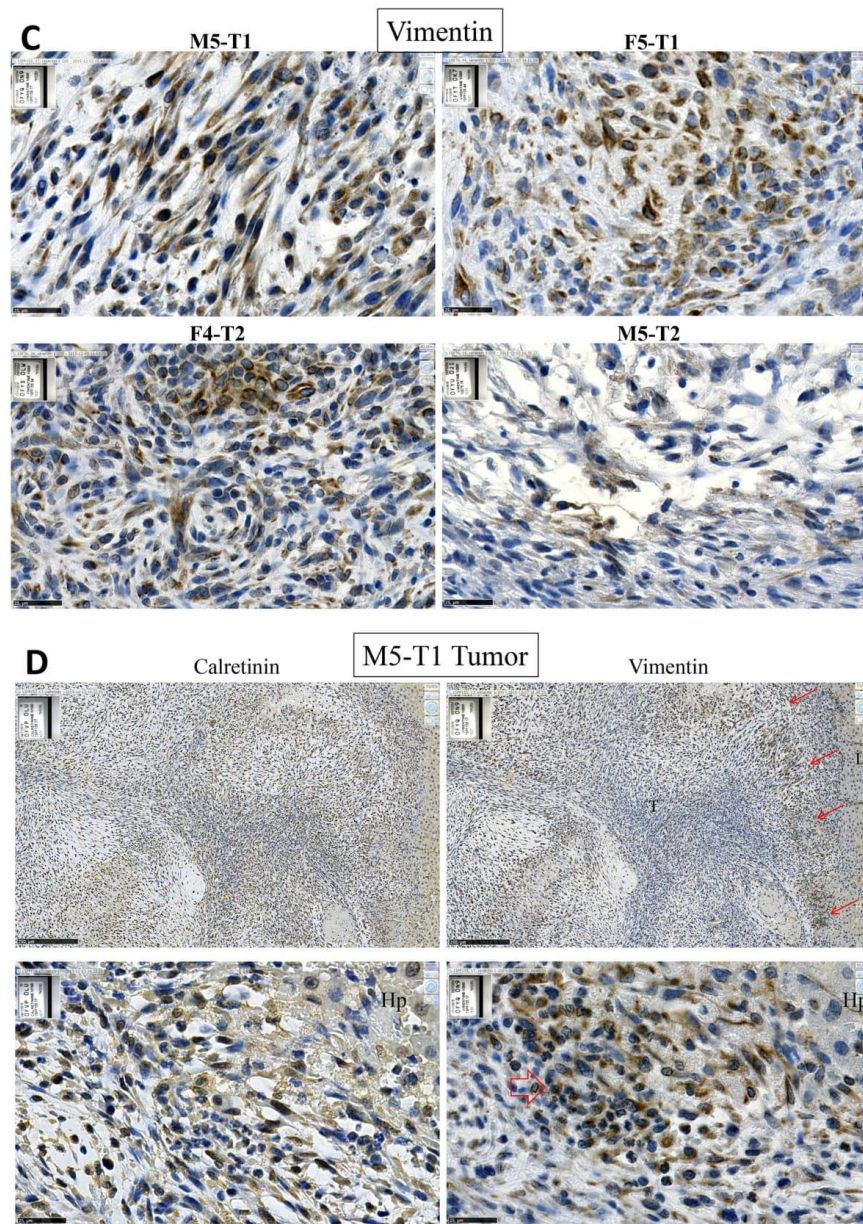


Figure 5 (Continued): C. vimentin of the tumors collected from syngeneic F344 rats after i.p. injection of the neoplastic rat cell lines M5-T1, F5-T1, F4-T2 and M5-T2, x 800, the scale bars represent 25 μm. Inserts show general views, x25, the scale bars represent 1 mm and the red arrow indicate the location of the magnification. Pa, pancreas; T, tumor; D, duodenum; L, liver; O, omentum. D. Comparison of IHC staining for calretinin (left) and vimentin (right) in a liver metastasis of M5-T1. Top, x 100, the scale bars represent 250 μm; bottom, x 800, the scale bars represent 25 μm; red arrows indicate foci of tumor cells exhibiting strong positivity of vimentin at the tumor front. Hp, hepatocytes.

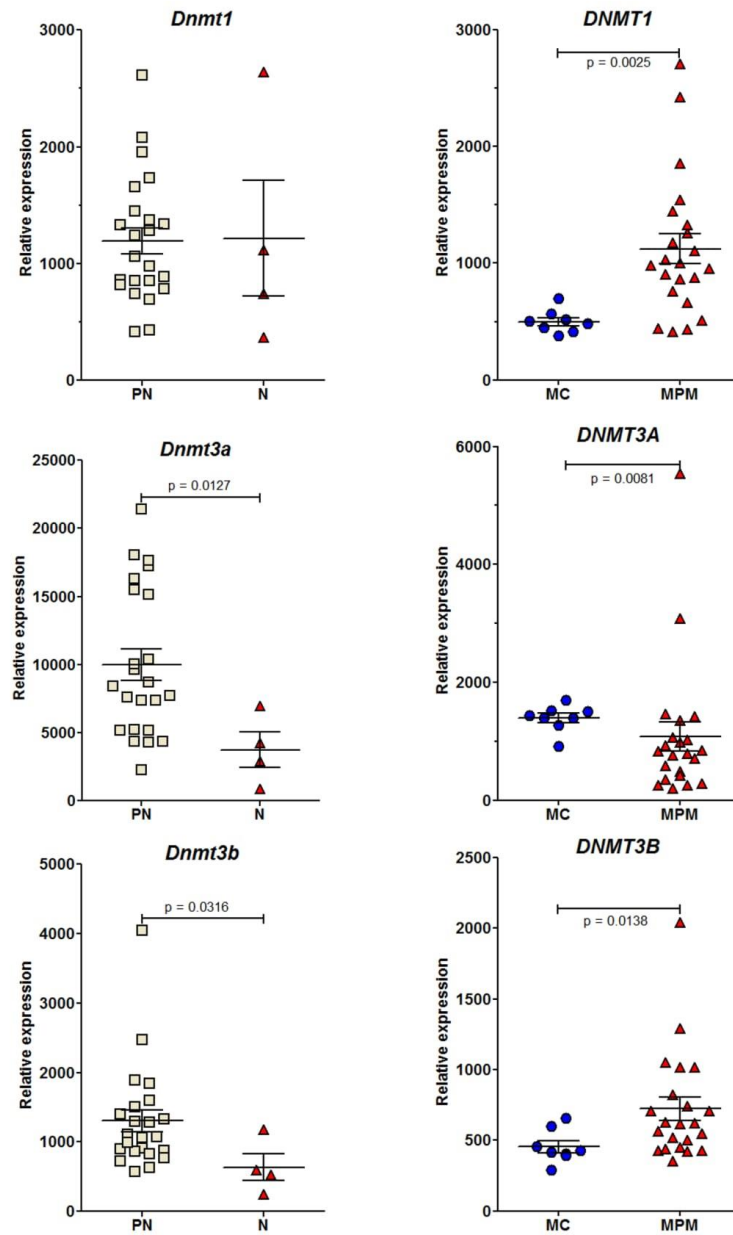


Figure 6: RT-PCR analysis of the relative expression of the three DNA methyltransferase genes. Rat (left column) and human (right column) cell lines.

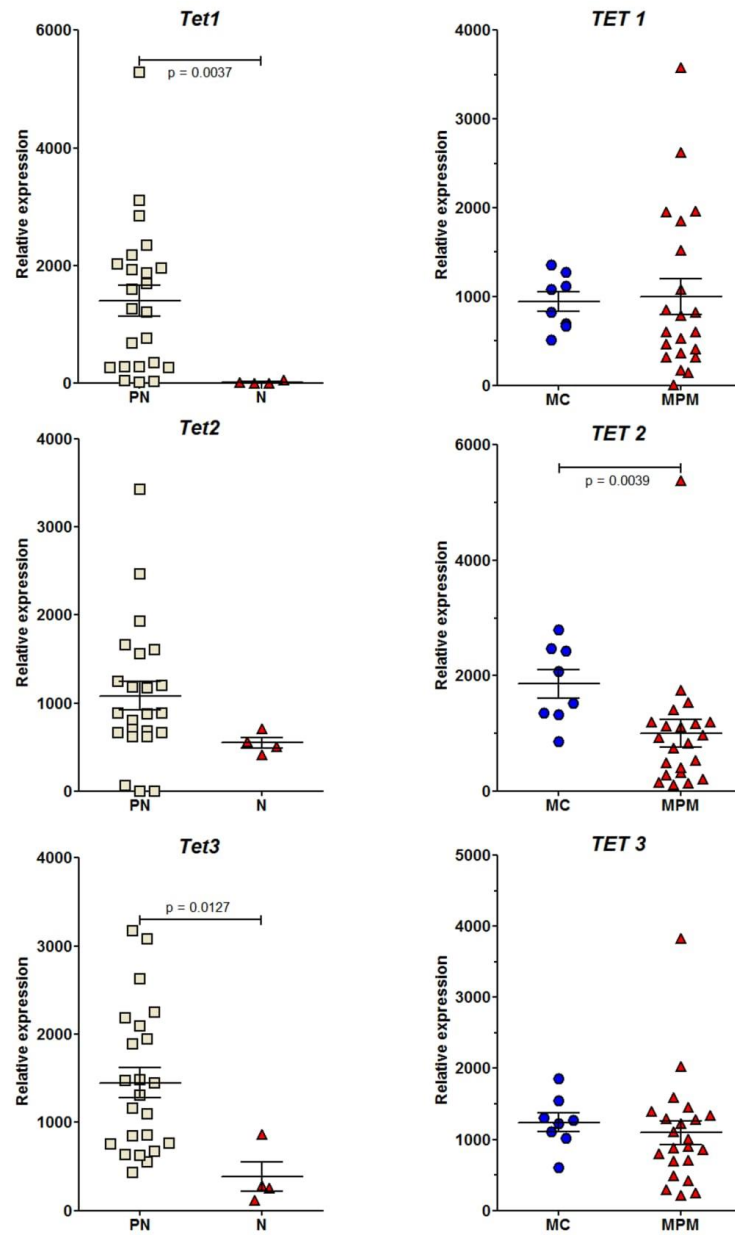


Figure 7: RT-PCR analysis of the relative expression of the three Ten-Eleven Translocation (TET) dioxygenase genes. Rat (left column) and human (right column) cell lines.

4, in the tetraploid metaphases with the same breakpoint on chromosome 15 (Figure 4D). Otherwise, no more metaphases with normal karyotypes were observed and all the chromosomes except chromosomes 7 and 16 were involved in either numerical alterations and/or structural alterations such as translocations and deletions. The major recurrent alteration was deletion of chromosome 5 (82% of all M5-T1 metaphases).

Changes in the expression of epigenetic regulators and 5-hmC levels in rat and human mesothelial cell lines and mesotheliomas

During the past decade, a number of studies investigating the role of epigenetics in cancer development have revealed altered hmC levels and/or *TET* and/or *DNMT* gene expression in human tumor tissues relative to their normal counterparts [9–13]. We previously showed a significant decrease in the global level of the 5-hydroxymethylcytosine, but not 5-methylcytosine between preneoplastic and neoplastic cell lines (Figure 2G, 2H). To confirm this both in rat and human MM cell lines, we investigated the changes in the expression of all these epigenetic regulators and tried to shed light in parallel on events occurring in preneoplastic mesothelial cells, an element that has never been documented.

Dnmt3a expression showed a significant decrease in neoplastic compared to preneoplastic cells in both rat and human mesothelial cell lines (Figure 6). A significant decrease in the expression of *Dnmt3b* was also observed in the rat. In parallel, a decrease in the expression of all *TET* genes was observed in both species (Figure 7). However, this decrease was significant in the rat for *TET1* and *TET3* between preneoplastic and neoplastic cell lines (Figure 7), and in humans for *TET2* between normal mesothelial cells (MC) and malignant pleural mesothelioma cell lines (MPM) (Figure 7). Of the four neoplastic rat cell lines, M5-T1 also presented the lowest expression of *TET3* (117.5 vs. 255.5, 287.3, and 863.9 for the three others). Finally, among preneoplastic rat cell lines, a significant decrease in the expression of *Dnmt3b* and all *TET* genes was observed in the three invasive neoplastic cell lines, relative to the PNsarc group (Figure S5).

Representative images of the M5-T1, F5-T1, F4-T2 and M5-T2 tumors (HPS staining of detailed views in Figure 8A, left column, general views in Figure S6) globally reveal low levels of staining for 5-hmC, which contrasts with the strong nuclear signals observed in the vicinal normal liver tissue (Figure 8A, right column). Conversely, in agreement with methylation levels on dot blots (Figure 2G), immunohistochemistry for 5-mC on the same sections showed equivalent levels of staining in tumor and normal liver. Quantification of the staining intensity for 5-hmC in tumor vs. liver revealed marked differences between the four different tumor types, with M5-T1 exhibiting the highest ratio (Figure 8B).

Immunohistochemical analysis of 5-hmC levels in human tissue microarrays revealed a progressive fall in the mean intensity of positive staining between normal mesothelial cells, grade I mesothelioma cells, and grade II mesothelioma cells. In parallel, the proportion of positively stained cells decreased, while the proportion of negative cells (in blue) increased (Figure 8C).

DISCUSSION

During development, the mesothelium, which consists of a monolayer of specialized cells with a typical cobblestone-like morphology, retains its potential to differentiate into cells of different phenotypes [17]. This mesenchymal “pluripotent” origin of mesothelioma cells is suggested to be responsible for the complex biology of MM and for the lack of efficacy of current therapies [2]. When injured through prolonged contact with fibers such as asbestos, mesothelial cells are transformed, move into the serosal fluid and thus can be easily isolated, cultured, characterized, and for some of them, transplanted into laboratory rodents to produce tumors. In this study, we took advantage of this diversity of experimental situations to establish a collection of cell lines which could significantly contribute to understanding some of the mechanisms of mesothelioma tumorigenesis.

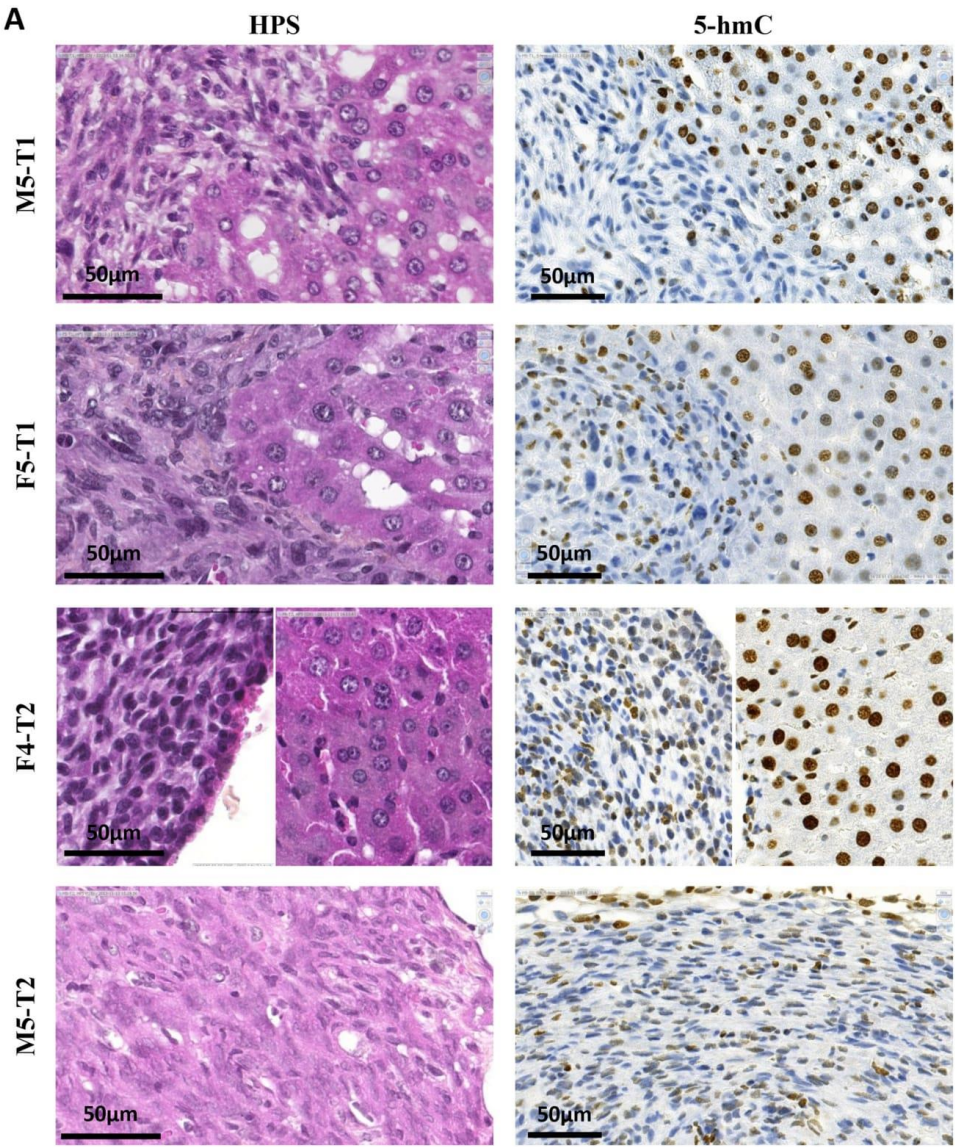
Expression profiles of three genes discriminate all neoplastic from preneoplastic rat mesothelial cell lines

Among this biocollection, four cell lines shared in common the potential to generate tumors *in vivo* after orthotopic transplantation into the peritoneal cavity of syngeneic rats. Our finding that *Lgals3* was up-regulated at the mRNA level in neoplastic relative to preneoplastic cell lines is in good agreement with accumulating evidence indicating that galectin-3 is closely involved in tumor cell transformation, migration, invasion and metastasis for a number of cancers [18, 19]. In addition, the observation of a higher expression level of *Lgals3* in the three invasive neoplastic cell lines compared with the non invasive M5-T2 suggests a relation with the tumor grading, as previously demonstrated in human gliomas [20].

Cdkn2a also represents a tumor suppressor gene that has previously been reported to represent a target for biological studies on mesothelioma [1, 21]. Investigations on this gene have proven to be a reliable way of separating benign from malignant mesothelial proliferations in tissues [22], in particular for the sarcomatoid subtype [23, 24]. In this study, the expression of *Cdkn2a* (*p16*) was significantly reduced, both in neoplastic relative to preneoplastic cell lines, and in human pleural mesothelioma relative to normal human mesothelial cells, thus confirming the potential of this gene for the diagnosis of MM. *Smad3*, a gene for which the expression

level was dramatically reduced in a tumorigenic cell line transformed with activated H-Ras compared with the normal parental epithelial cells [25], recently appeared to represent an important determinant of the progression of tumorigenesis. Herein, the significant decrease in the expression of *Smad3* observed in all neoplastic relative

to preneoplastic cell lines is also in good agreement with the initial report of Han and colleagues, demonstrating that suppression of *Smad3* expression occurred in human gastric tumor cells in contrast to neighboring normal tissue [26].



(Continued)

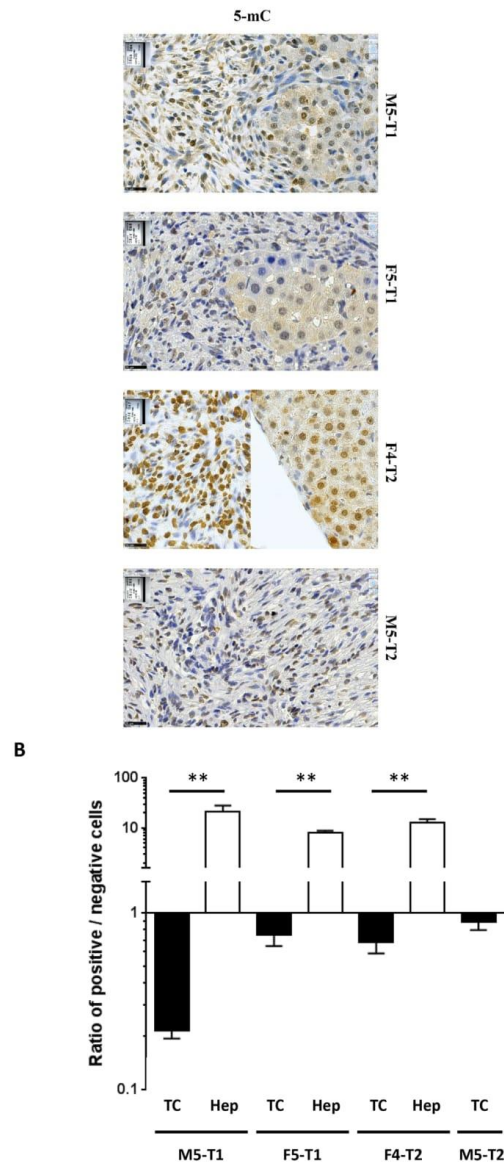


Figure 8: Immunohistochemical staining for 5-hmC of rat and human mesotheliomas. A. Histology and immunohistology of rat mesotheliomas collected three weeks after i.p. inoculation of the four neoplastic cell lines into syngeneic F344 rats. Left column: HPS staining, detailed views of the fields denoted by the red arrows on general views (see Figure S5), showing the morphology of tumor cells invading the liver tissue (M5-T1, F5-T1), attached to it (F4-T2) or growing on the omentum (M5-T2) without metastases in the vicinal normal tissues. The scale bars represent 50 μ m. Middle column: IHC figures of anti-5-hmC immunostaining of the tumor tissue (left part) and liver parenchyma (right part), the scale bars represent 50 μ m. Right column: IHC figures of anti-5-mC immunostaining of the tumor tissue (left part) and liver parenchyma (right part), the scale bars represent 25 μ m. **B.** Semi-quantification of 5-hmC immunostaining in the four rat mesothelioma models. The numbers of positive and negative cells in the tumor tissue and the liver parenchyma were determined on five high-magnification fields (x 800) containing both tumor tissue and liver parenchyma (except for the noninvasive M5-T2 cell line).

(Continued)

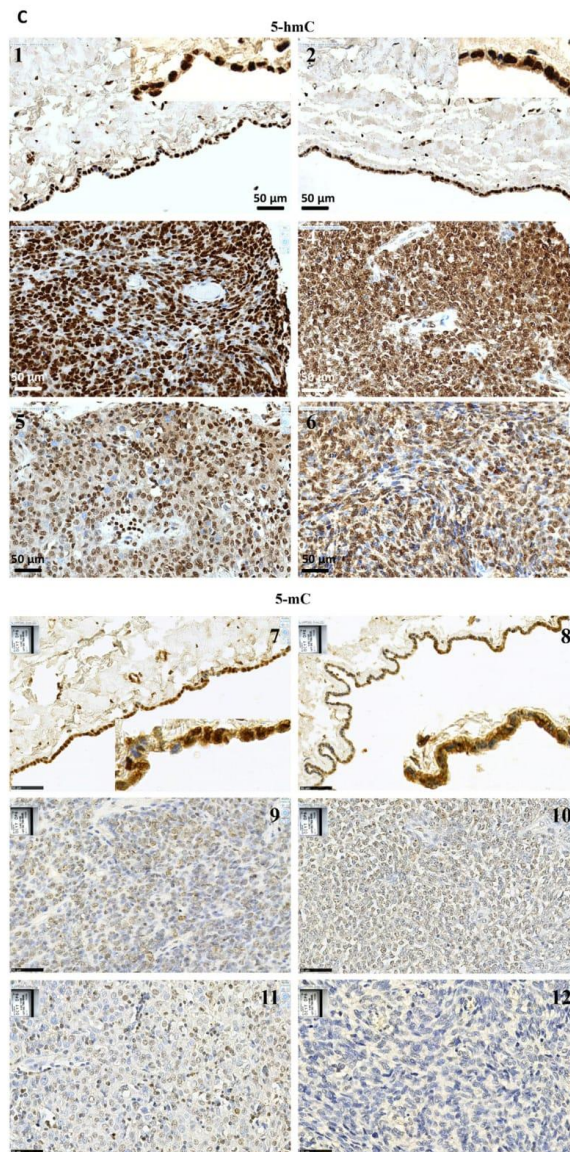


Figure 8 (Continued): C. Representative images of normal mesothelial cells of the pleura and pericardium (1, 2, inserts show high magnification), and malignant mesothelioma, grade I (3, 4) and grade II (5, 6), stained with an anti-5-hmC antibody, scale bars represent 50 μm. IHC of normal mesothelial cells of the pleura and pericardium (7, 8, inserts show high magnification), and malignant mesothelioma, grade I (9, 10) and grade II (11, 12), stained with an anti-5-mC antibody, scale bars represent 50 μm.

Characterization of preneoplastic rat mesothelial cell lines

To date, most studies on preneoplastic cell lines have been conducted either on spontaneously transformed normal cells in culture [27] or on immortalized cell clones isolated from biopsies [28]. Additional insights have been obtained from histopathological observations made on both preneoplastic and neoplastic cells [29] and by the use of transgenic animals [30]. However, all these experimental approaches present important limitations. Cell lines selected under *in vitro* conditions for a long period of time present many alterations of specific cellular pathways compared with tissues [31]. Data obtained from biopsies or/and histopathologic observations from patients are limited by the genetic heterogeneity of the source materials. Finally, many inbred transgenic and targeted mutant mice have been created using animals of mixed genetic backgrounds [32]. In contrast with all these situations, in our study, the biocollection of cell lines was obtained from F344 rats, an inbred strain known for its stable genetic background [33], induced with the same material at the same age, which is likely to significantly limit the number of parameters involved in mesothelioma tumorigenesis.

Among the 23 preneoplastic rat mesothelial cell lines established, two groups were identified according to the expression profiles of eight genes and to morphology in culture. The decreased expression of the *Msln* gene observed between the PN-[Epith] and PNsarc groups is in good agreement with the differences in the expression profiles previously observed at both the mRNA and protein levels [34], and with immunohistochemical findings reported by Ordóñez [35]. The low level of *Msln* expression in the PNsarc group, in contrast to the PN-[Epith] group, could also be due to instability of *Msln* mRNA, according to the presence of a polymorphic variant and regulation by micro-RNA [36]. Similarly, although podoplanin has been presented as an interesting immunohistochemical marker in the diagnosis of mesothelioma [37], its expression is frequent in the epithelioid subtype but usually absent in the sarcomatoid subtype [38, 39], in agreement with our findings on PNsarc cell lines. This observation was further confirmed in iron-induced high-grade rat MM where only epithelioid subtypes were strongly positive for podoplanin [21].

We found a decrease in the expression of the *Ezr* gene, coding for ezrin, a multifunctional membrane cytoskeleton linker that regulates the structure and function of specific domains of the cell cortex. This could be explained by the fact that few microvilli have been observed in the sarcomatoid subtype [40], as ezrin was originally identified in high amounts in these structures [41], an ultrastructural characteristic of normal mesothelial cells and epithelioid MM [42]. Regarding *Hmgbl* expression, besides its well-documented proinflammatory role, evidence for its restorative effects leading to tissue

repair and regeneration have previously been reported [43]. Thus, the decrease in its expression observed both in PNsarc and neoplastic cell lines could participate in nuclear instability, in good agreement with the fact that its localization in the nucleus maintains nuclear stability under stress [44].

Changes among preneoplastic epithelioid rat mesothelial cell lines

Among PN-[Epith] cell lines, the first significant *Cdh1* expression loss occurred between the Sbnl and PNep subgroups, preceding the increase in expression of both *Tgfb1* and *Acta2* in the two PNint cell lines, suggesting a link with the EMT process [45]. In parallel, the observation of a dramatic increase *Igf1* expression also agrees with the recent demonstration of the role of deregulation of cellular energetics in the development of preneoplastic lesions [7], in relation with a very early event of cadherin modulation in the oncogenic EMT program [46]. Under certain conditions of stimulation, the increased production of IL-10 transcript by rat peritoneal mesothelial cells has also been shown [47], suggesting a relation with an inflammatory process. The dramatic change observed in the expression of *Myc* suggests a link with the dynamic process of genomic instability related to this oncogene, which has been extensively documented during the past two decades [48]. Finally, the elevated expression of *Tgfb1*, *Zeb1* and *Acta2* and the additional loss of expression of *Cdh1* also observed between the PNep subgroup and the PNsarc group are consistent with the dual role that has been reported for *Zeb1*, a repressor of gene transcription with a target gene such as *Cdh1*, and also a transcriptional activator that targets genes such as *Acta2* [49].

Expression profiles and IHC markers of invasive MM rat cell lines share more homology with the PNsarc group than does M5-T2, suggesting a mesenchymal phenotype

Mesothelioma tumorigenesis involves mesothelial progenitor cells [17, 50, 51] able to switch between different cell phenotypes in both directions depending on the local environment, which can differentiate to epithelioid or mesenchymal phenotypes. We previously showed that among the four mesothelioma cell lines, three exhibited invasive capacities in the Boyden test, in agreement with their metastatic potential observed in this study [52]. Herein, the dramatic decrease in the expression of *Pdpn*, *Ezr*, *Msln*, *Hmgbl*, *Wt1* and *Cdh1* shared by these three cell lines and the PNsarc group, compared with the PN-[Epith] group, tend to confirm that these three cell lines and the PNsarc group present in common the characteristics of a mesenchymal phenotype. In agreement with previous findings [40], the overall weak expression of calretinin and clear positivity for vimentin

of tumors generated by these three MM cell lines leads to the conclusion that these tumors can be diagnosed as sarcomatoid.

In contrast, in the M5-T2 cell line, this common decrease was restricted to *Ezr*, *Msln*, *Hmgbl1*, and *Cdh1*, the high expression profiles of two genes, *Pdpn* and *Wt1*, together with the higher percentage of cells strongly positive for WT-1 in IHC suggesting the occurrence of some reminiscent homologies with the PN-[Epith] group. The singular situation of the M5-T2 cell line was reinforced by the observation of a maximum expression of five other genes, *Rassf1*, *Zeb1*, *Vim*, *Acta2* and *Tgfb1*, which was common to the PNsarc group, in contrast with the three invasive mesothelioma cell lines which presented significantly lower expression levels.

Karyotype alterations and aggressiveness

The comparison of expression profiles with the results of karyotype analysis for the M5-T1 cell line allows the definition of several points of interest that appear to be related to aggressiveness. A recent study confirmed that *p16* deletion is a good marker of malignancy, both in pleural and peritoneal mesotheliomas with invasive components [53]. A common chromosomal deletion was detected at 5q32, containing the *Cdkn2a* gene, and a homozygous deletion was observed in the majority of cases from epithelioid to sarcomatoid and biphasic mesotheliomas [54]. The results from our model tend to confirm this fact, as M5-T1 cells exhibited the lowest level of *Cdkn2a* expression while spectral karyotyping of this cell line revealed a recurrent, large deletion of one rat chromosome 5, including the q32 band, in 82% of metaphases, suggesting at least loss of heterozygosity for *Cdkn2a*. In the rat, the *Pdpn* gene is also localized very close to *Cdkn2a* on chromosome 5, at 5q36, where this deletion was observed, a point that could also explain the lowest *Pdpn* expression level of this cell line. The dramatic decrease observed in the expression of *Smad3* could also be related to the important deletion of chromosome 8, which bears this gene. Finally, the very low expression level of *Msln* specifically observed in the three invasive cell lines, in contrast to M5-T2, also appears to be related to another deletion occurring on chromosome 10, this the *Msln* gene being localized to 10q12-q21 in the rat.

Epigenetic regulators and tumorigenesis

Global DNA hypomethylation and locus-specific DNA hypermethylation have been identified as key features of many cancers [55, 56]. In the specific case of mesothelioma, epigenetic dysregulation is now established to be a critical mode of action of asbestos, and it has been suggested to be associated with inflammation-related processes common to several cancers. A large study of epigenomic alterations in 158 pleural MM samples

obtained from human patients revealed hundreds of loci that had different methylation levels between tumor and non tumor pleura, identifying seven distinct methylation subclasses and leading to the idea that asbestos-associated inflammation could drive this epigenetic diversity [57]. In the latter study, *Dnmt3b* was mentioned in the list of genes having significantly lower methylation in tumors, suggesting epigenetic dysregulation. This observation presents interesting connections with our findings in the rat biocollection of cell lines, a significant decrease in the expression of *Dnmt3b* being observed between all preneoplastic and neoplastic cell lines, as well as between the PNsarc group and neoplastic cell lines. The different evolution observed in the human biocollection for the expression of this enzyme, while a common pattern of expression profile was observed in the two species for *Dnmt3a*, could also be explained by recent reports indicating that the two enzymes have overlapping functions and that their roles in cancers may be more complex than previously believed [58]. In our study, the final fall in expression of *de novo Dnmt3a* and *Dnmt3b* could be explained by the recent demonstration of downregulation after induction of EMT by TGF β in lung cancer cells [59]. Our results are also in good agreement with the recent finding that both *de novo* DNMTs showed a different pattern of expression relative to DNMT1 during carcinogenesis, with an overexpression in early cancer stages and a final reduced expression in tumors [60]. Thus, this event could represent the situation found in MM with the worst outcome. The involvement of DNA methylation in EMT has also been documented, hypermethylation of the promoter region being one of the key factors leading to a reduced mRNA expression of *Cdh1* during EMT [61]. This could contribute to the final fall in the expression of *Cdh1*.

In our study, another striking result concerned the parallel evolution of the expression of *TET2/TET3* and *Dnmt3a/Dnmt3b*. So far, although *TET3* has been considered to be the most important regulator [62], relationships between *TET3* and cancer have been poorly investigated. A recent study demonstrated that the low level of 5-hmC observed in carcinoma *in situ* cells (CIS) of the testis corresponded to the absence of expression of TETs in these cells, especially *TET3* [63]. We observed here that the most aggressive MM cell line, M5-T1, showed the lowest expression of *TET3*, an observation that could be explained by the deletion of the q34-q44 region of chromosome 4, which includes the *TET3* gene. In addition to *Cdkn2a* on chromosome 5, another observation relating karyotypic alterations to aggressiveness concerns the *NF2* gene coding for merlin, the second major alteration in human MM, which was shown to be the target tumor suppressor gene of 22q12 loss and found to be mutated in the majority of human MM [64]. Interestingly, this gene, located on rat chromosome 14q22, was included in a deletion observed in 79% of M5-T1 metaphases.

The parallel lowest expression of *Dnmt3b* and lowest 5-hmC level, especially in the tumor cells located at the invading front in the liver tissue, provides the first evidence of a clear link between these three epigenetic parameters. Evidence of collaboration between TET2 and TET3 proteins to suppress aberrant hematopoiesis and hematopoietic transformation has also been reported recently [65]. Interestingly, the parallel between *DNMT3A* and *TET2*, and their mechanisms of cooperation, have been mentioned for future studies [12]. *TET2* represents a critical regulator for normal and malignant hematopoiesis [66], and its expression has recently been shown to represent a prognostic factor for colorectal carcinoma recurrence and outcome [67]. *TET2* expression is also significantly associated with 5-hmC levels in esophageal squamous cell carcinoma [68].

In conclusion, in this work we present a biocollection of rat mesothelial cells at different stages of carcinogenesis. The transcriptomic and karyotypic characterizations of these rat MM cells showed high similarities with human MM cells, highlighting the pertinence of our preclinical models for future evaluation of new therapeutic strategies. Finally, evaluation of this biocollection allowed us to suggest that epigenetic alterations, downregulation of TETs and DNMTs and a decrease of 5-hmC in tumor cells are all correlated with the acquisition of an aggressive phenotype, in good agreement with human MM.

MATERIALS AND METHODS

Establishment of experimental rat cell lines

Fischer F344 rats were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, 69, France) and maintained under standard conditions in the UTE IRS-UN animal holding area in agreement with European Union guidelines for the care and use of laboratory animals in research protocols. The experiments were approved by the regional ethical committee for animal experiments (CEE.A.2011.38). Rats were fed a pelleted standard diet (RM1, Special Diet Services, Witham, Essex, UK), with tap water *ad libitum*, and were anesthetized via an isoflurane chamber (Forene®, Abbott France) and euthanized with Doletal® (Centravet, Pluduno, Plancoët, France).

The cell lines used in this study belong to a biocollection established in 2011 [http://www.inserm-transfert.fr/]. To establish this biocollection, at 8 weeks of age, a group of 33 rats (16 males and 17 females) received an intraperitoneal inoculation of 10 mg crocidolite fibers suspended in 0.5 ml 0.9% NaCl (UICC analytical sample, ref. 02704A, Neyco, 75017 Paris, France). Between 136 and 415 days after induction, after euthanasia, 2 ml sterile RPMI medium was injected intraperitoneally,

the peritoneal lavage fluids were collected under sterile conditions and then placed into culture. This step led to the establishment of 23 transformed mesothelial cell lines. After 378 days of induction, one male rat was necropsied about one hour after death, presenting signs of hemorrhage, widespread neoplastic implants and nodules in the peritoneal cavity as previously described [69], which, when dissociated with a scalpel and cultured, led to the first neoplastic MM cell line M5-T1. During the next two weeks, three additional MM cell lines were established from dissociated neoplastic implants and nodules were collected on two females and one male euthanized rats (F4-T2, F5-T1 and M5-T2). These cell lines were distinguished from the former 23 by their capacity to produce macroscopic tumors in syngeneic F344 rats three weeks after intraperitoneal inoculation of 5×10^6 cells.

Human cell lines

Mesothelioma cell lines were established from pleural effusions collected by thoracocentesis of patients with cancers, as previously described [70]. All patients provided written informed consent and the study was approved by the ethics committee "Comité de Protection des Personnes Ouest IV – Nantes, CPP N° 877/2011", CHU de Nantes, France. Isolation and culture of normal mesothelial cells from pleura have been described previously [70]. Primary peritoneal mesothelial cells (PMC) were purchased from Tebu-bio biosciences and cultured according to the manufacturer's recommendations.

Cell culture and chemicals

All cell lines were maintained in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Eurobio), 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, 2 mM L-Glutamine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and cultured at low passage level (6 to 10) in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C.

Proliferation assays and cell cycle analysis

For determination of the population doubling time in the mid-log phase and the saturation density at plateau, in order to approach the conditions of proliferation *in vivo* after transplantation, cell lines were seeded at 3×10^5 cells/well at time 0 in 6-well plates (Nunc lon delta, Nunc AS, Denmark) and counted in a Malassez hemocytometer, the entire growth curve being obtained from at least 12 time points. Cell cycle analysis was conducted on a NucleoCounter® NC-3000™ (ChemoMetec, Allerød, Denmark) using NC-Slide A8™ after trypsinization, centrifugation, fixation of cells with ethanol, and

incubation with DAPI at 37°C for 5 minutes. The cell number in each phase of the cell cycle was determined and calculated as a percentage of the total cell population.

Measurement of cell migration

Cell migration was analyzed for all rat cell lines by the scratching test [71]. When cell density was confluent, for each cell line cultivated in 12-well plates (3.5 cm² / well), one wound line in the form of a cross was made by scratching the cell monolayer with a plastic pipette tip. Floating cells were washed out and fresh medium was added. The narrowing width of the scratch was recorded by taking photographs under an inverted Zeiss Axio Observer.Z1 microscope from 17 h after the scratch.

Total RNA isolation and real-time PCR

Total RNA was extracted from one 75 cm² culture plate at preconfluence for each cell line using the NucleoSpin RNA II Kit according to the manufacturer's instructions (Macherey-Nagel, Hoerd, France). The total RNAs were next treated with an rDNase solution to remove contaminating genomic DNA, and subsequently purified. One microgram of total RNA was reverse-transcribed using Moloney-Murine Leukemia Virus Reverse-Transcriptase (Invitrogen). PCR reactions were performed using an Mx4000 thermocycler (Stratagene) with 10X QuantiTect Primer Assays (Qiagen), and the RT² Real-Time SYBR-Green/ROX PCR Mastermix (tebu-bio, Le Perray-en-Yvelines, France), according to the manufacturer's instructions. The thermal cycling protocol was followed by a melting curve analysis to check for the absence of nonspecific products. For each transcript, the efficiency of the PCR reaction was determined by the slope of the standard curve generated from serial dilutions of the same cDNA sample (pool of reverse-transcribed RNA samples). The relative amount of target RNA, called the Starting Quantity (SQ), was determined using the MxPro software, by comparison with the corresponding standard curve for each sample performed in duplicate. Each transcript level was normalized by division with the expression values of the acidic ribosomal phosphoprotein P0 housekeeping gene (*RPLP0*), used as an internal standard.

Tumor samples and immunohistochemistry

For histological examination, the paraformaldehyde-fixed, paraffin-embedded sections of rat tumor samples (M5-T1, F5-T1, F4-T2 and M5-T2), and surrounding normal/invaded tissues when present, were cut with a Bond Max automaton (Menarini, Rungis, France) and stained with hematoxylin-phloxine-saffron (HPS). A human mesothelioma array with normal mesothelium tissue (lung and cardiac pericardium) was obtained from US Biomax Inc. (Rockville, MD, USA). Antibodies

used for immunohistochemical analyses were anti-WT-1 ab15249, anti-calretinin ab16694 and anti-vimentin ab8978 from Abcam, anti ESA/EPCAM (MOC 31) LS-C331328 from LSBio, and anti-5-hmC 39769 (1/200) and anti-5-mC 61255 (1/60) from Active Motif Europe (La Hulpe, Belgium), with an anti-mouse secondary antibody and the N-Histofine Simple Stain Mouse MAX Peroxidase (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) as the detection reagent. Histopathology slides were scanned with a Nanozoomer 2.0 HT (Hamamatsu, Japan). To semiquantify histochemical staining on rat tumor slices, five randomly selected fields of 27,000 µm² were analyzed both by manual counting and by color deconvolution of TIF images using Fiji software and the Otsu method [72]. Histochemical staining of the human mesothelioma array with anti-5-hmC and anti-5-mC was analyzed on 20 samples of normal tissue, 20 samples of grade I malignant mesothelioma (with tumor invading the submucosa) and 16 samples of grade II malignant mesothelioma (with tumor invading the muscularis propria). The small number of samples available on the microarray did not allow an analysis of grades III-IV.

Dot blots

DNA samples were denatured by the addition of denaturation buffer (0.1 mM NaOH) and subsequently heated for 5 minutes at 95°C. The reaction was then stopped by addition of 6.6 mM ammonium acetate. Samples were rapidly chilled for 5 minutes on wet ice and then applied to a positively charged nylon membrane (Immobilon-P Transfer, Millipore), previously charged and rehydrated by dipping for 15 seconds into ethanol and 5 minutes in tris-buffered saline with Tween 20 (TBST). The membrane was then air dried for 15 minutes. Denatured DNA was spotted onto the membrane and air dried for 45 to 60 minutes, UV-cross-linked to the membrane (UV Stratalinker 2400), and incubated for 1 hour with saturation buffer (TBST 1%BSA). Primary antibody (5-hmC dilution 1/10,000; 5-mC dilution 1/5,000, Active Motif, La Hulpe, Belgium) was incubated overnight at 4°C with agitation. The membrane was washed three times with TBST and incubated with the anti-rabbit secondary antibody (HRPanti IgG, Covalab). The membrane was washed again three times with TBST and the signal was revealed using enhanced chemiluminescence (ECL) substrate (Immobilon western chemiluminescent HRP substrate, Millipore) and read with a Biorad Chemidoc MP Imaging System. To control the DNA load, DNA was quantified using gel red and the membrane was scanned with the Biorad imager. Dot blot signals were quantified and normalized to the intensity of the corresponding gel red signal. To ensure specificity of the antibody, naked DNA, methylated DNA, and 5-hmC DNA control (Active Motif) were used (data not shown).

Multicolor FISH (M-FISH)

Metaphases were obtained using standardized harvesting protocols as described previously. Briefly, colcemid solution (0.03 µg/ml) was added to F3-1 and M5-T1 cells 90 minutes and 30 minutes before harvesting, respectively. Cells were treated with hypotonic solution (0.075M KCl), fixed three times with Carnoy's fixative (3:1 methanol/acetic acid) and spread on prechilled glass slides. M-FISH was performed with the aim of identifying numerical and structural alterations in both cell lines. The probe cocktail containing differentially labeled, chromosome-specific painting probes – except for chromosomes 13 and 14, which were distinguished by their DAPI banding (22XRat kit MetaSystems, Altlußheim, Germany) – was denatured and hybridized to denatured metaphase spreads according to the manufacturer's protocol for the Multicolor FISH probe kit for rat chromosomes (MetaSystems). After counterstaining with DAPI (1 µg/ml), the signal detection and analysis of subsequent metaphases used the Metafer system and Metasystems' ISIS software, respectively. F3-1 and M5-T1 karyotypic formulas were reported using an abbreviated format of the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN), omitting breakpoint information either when the quality of counterstained chromosomes or the blending of colors through fluorescence flaring prevented the accurate definition of breakpoints. Chromosomal gains or structural aberrations had to be detected in at least two metaphases and chromosomal losses in three metaphases to be acknowledged as clonal. Chromosome identification and band nomenclature were indicated according to the standard rat karyotype [73].

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney nonparametric test for comparison of the means, using the Graph-Pad Prism software. A *p* value < 0.05 was considered to be statistically significant. All graphs present the mean and standard deviations of at least three independent experiments.

ACKNOWLEDGMENTS

The research leading to these results has received funding from the National Health and Medical Research Institute (Inserm), the “Fondation pour la Recherche Médicale” (FRM), the “Ligue contre le Cancer” (Ligue Nationale and the Ligue inter-régionale du Grand Ouest; comités 49, 56, 85), the “Institut de Recherche en Santé Respiratoire des Pays de la Loire” (IRSR PdL), the “Région Pays de la Loire”, and the ARSMESO44 association.

We gratefully acknowledge Stéphanie Blandin and Cécile Deleine (MicroPICell facility) for their excellent technical assistance.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no competing interests.

REFERENCES

1. Sekido Y. Genomic abnormalities and signal transduction dysregulation in malignant mesothelioma cells. *Cancer Sci.* 2010; 101:1-6.
2. Pinton G, Manente AG, Tavian D, Moro L, Mutti L. Therapies currently in phase II trials for malignant pleural mesothelioma. *Expert Opin Investig Drugs.* 2013; 22:1255-1263.
3. Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, MacLeod RA, Masters JR, Nakamura Y, Reid YA, Reddel RR, Freshney RI. Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int J Cancer.* 2010; 127:1-8.
4. Hughes P, Marshall D, Reid Y, Parkes H, Gelber C. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need? *Biotechniques.* 2007; 43:575, 577-578, 581-582.
5. Blanco D, Vicent S, Elizegi E, Pino I, Fraga MF, Esteller M, Saffiotti U, Lecanda F, Montuenga LM. Altered expression of adhesion molecules and epithelial-mesenchymal transition in silica-induced rat lung carcinogenesis. *Lab Invest.* 2004; 84:999-1012.
6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144:646-674.
7. Evert M, Calvisi DF, Evert K, De Murtas V, Gasparetti G, Mattu S, Destefanis G, Ladu S, Zimmermann A, Delogu S, Thiel S, Thiele A, Ribback S, et al. V-AKT murine thymoma viral oncogene homolog/mammalian target of rapamycin activation induces a module of metabolic changes contributing to growth in insulin-induced hepatocarcinogenesis. *Hepatology.* 2012; 55:1473-1484.
8. Zhang Q, Liu X, Gao W, Li P, Hou J, Li J, Wong J. Differential regulation of the Ten-Eleven Translocation (TET) family of dioxygenases by O-linked β-N-acetylglucosamine transferase (OGT). *J Biol Chem.* 2014; 289:5986-5996.
9. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell.* 2012; 150:12-27.
10. Haffner MC, Chau A, Meeker AK, Esopi DM, Gerber J. Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers. *Oncotarget.* 2011; 2:627-637. doi: 10.18632/oncotarget.316.
11. Hsu C-H, Peng K-L, Kang M-L, Chen Y-R, Yang Y-C, Tsai C-H, Chu C-S, Jeng Y-M, Chen Y-T, Lin F-M, Huang H-D, Lu Y-Y, et al. TET1 suppresses cancer invasion by activating the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Cell Reports.* 2012; 2:568-579.

12. Hamidi T, Singh AK, Chen T. Genetic alterations of DNA methylation machinery in human diseases. *Epigenomics*. 2015; 7:247-265.
13. Yang H, Liu Y, Bai F, Zhang J-Y, Ma SH, Liu J, Xu Z-D, Zhu H-G, Ling Z-Q, Ye D, Guan K-L, Xiong Y. Tumor development is associated with decrease of TET gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation. *Oncogene*. 2013; 32:663-669.
14. Kovalchuk O, Tryndyak VP, Montgomery B, Boyko A, Kutanzi K, Zemp F, Warbritton AR, Latendresse JR, Kovalchuk I, Beland FA, Pogribny IP. Estrogen-induced rat breast carcinogenesis is characterized by alterations in DNA methylation, histone modifications and aberrant microRNA expression. *Cell Cycle*. 2007; 6:2010-2018.
15. Martinez-Romero C, Rooman I, Skoudy A, Guerra C, Molero X, Gonzalez A, Iglesias M, Lobato T, Bosch A, Barbad M, Real FX, Hernández-Muñoz I. The epigenetic regulators Bmi1 and Ring1B are differentially regulated in pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Pathol*. 2009; 219:205-213.
16. Koturbash I, Melynyk S, James SJ, Beland FA, Pogribny IP. Role of epigenetic and miR-22 and miR-29b alterations in the downregulation of Mat1a and Mthfr genes in early preneoplastic livers in rats induced by 2-acetylaminofluorene. *Mol Carcinogenesis*. 2013; 52:318-327.
17. Lansley SM, Searles RG, Hoi A, Thomas C, Moneta C, Herrick SE, Thompson PJ, Newman M, Sterett GF, Prêle CM, Mutsaers SE. Mesothelial cell differentiation into osteoblast- and adipocyte-like cells. *J Cell Mol Med*. 2010; 15:2095-2105.
18. Song L, Tang J-w, Owusu L, Sun M-Z, Wu J, Zhang J. Galectin-3 in cancer. *Clin Chim Acta*. 2014; 431:185-191.
19. Thijssen VL, Heusschen R, Caers J, Griffioen AW. Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: a systematic review. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1855:235-247.
20. Binh NH, Satoh K, Kobayashi K, Takamatsu M, Hatano Y, Hirata A, Tomita H, Kuno T, Hara A. Galectin-3 in preneoplastic lesions of glioma. *J Neurooncol*. 2013; 111:123-132.
21. Hu Q, Akatsuka S, Yamashita Y, Ohara H, Nagai H, Okazaki Y, Takahashi T, Toyokuni S. Homozygous deletion of CDKN2A/2B is a hallmark of iron-induced high-grade rat mesothelioma. *Lab Invest*. 2010; 90:360-373.
22. Hwang HC, Sheffield BS, Rodriguez S, Thompson K, Tse CH, Gown AM, Churg A. Utility of BAP1 immunohistochemistry and p16 (CDKN2A) FISH in the diagnosis of malignant mesothelioma in effusion cytology specimens. *Am J Surg Pathol*. 2016; 40:120-126.
23. Wu D, Hiroshima K, Matsumoto S, Nabeshima K, Yusa T, Ozaki D, Fujino M, Yamakawa H, Nakatani Y, Tada Y, Shimada H, Tagawa M. Diagnostic usefulness of p16/CDKN2A FISH in distinguishing between sarcomatoid mesothelioma and fibrous pleuritis. *Am J Clin Pathol*. 2013; 139:39-46.
24. Tochigi N, Attanoos R, Chirieac LR, Allen TC, Cagle PT, Dacic S. p16 deletion in sarcomatoid tumors of the lung and pleura. *Arch Pathol Lab Med*. 2013; 137:632-636.
25. Daly AC, Vizan P, Hill CS. Smad3 protein levels are modulated by Ras activity and during the cell cycle to dictate transforming growth factor- β responses. *J Biol Chem*. 2010; 285:6489-6497.
26. Han S-U, Kim H-T, Seong DH, Kim Y-S, Park Y-S, Bang Y-J, Yang H-K, Kim S-J. Loss of the Smad3 expression increases susceptibility to tumorigenicity in human gastric cancer. *Oncogene*. 2004; 23:133-1341.
27. Rozich RA, Mills DR, Brilliant KE, Callanan HM, Yang DQ, Tantravahi U, Hixson DC. Accumulation of neoplastic traits prior to spontaneous in vitro transformation of rat cholangiocytes determines susceptibility to activated ErbB-2/Neu. *Exp Mol Pathol*. 2010; 89:248-259.
28. van Zeeburg HJ, Graveland AP, Brink A, Nguyen M, Leemans CR, Bloemena E, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. Generation of precursor cell lines from preneoplastic fields surrounding head and neck cancers. *Head Neck*. 2013; 35:568-574.
29. Odze RD. Neoplasia without dysplasia, lessons from Barrett esophagus and other tubal gut neoplasms. *Arch Pathol Lab Med*. 2010; 134:896-906.
30. Kleinberg DL, Wood TL, Furth PA, Lee AV. Growth hormone and insulin-like growth factor-I in the transition from normal mammary development to preneoplastic mammary lesions. *Endocrine Rev*. 2009; 30:51-74.
31. Sandberg R, Ernberg I. The molecular portrait of in vitro growth by meta-analysis of gene-expression profiles. *Genome Biol*. 2005; 6:R65.
32. Yoshiki A, Moriaki K. Mouse phenome research: implications of genetic background. *ILAR J*. 2006; 47:94-102.
33. Festing MFW. Inbred strains should replace outbred stocks in toxicology, safety testing, and drug development. *Toxicol Pathol*. 2010; 38:681-690.
34. Tan K, Kajino K, Momose S, Masaoka A, Sasahara K, Shiomi K, Izumi H, Abe M, Ohtsuiji N, Wang T, Hino O, Fujii H. Mesothelin (MSLN) promoter is hypomethylated in malignant mesothelioma, but its expression is not associated with methylation status of the promoter. *Hum Pathol*. 2010; 41:1330-1338.
35. Ordóñez NG. Value of mesothelin immunostaining in the diagnosis of mesothelioma. *Mod Pathol*. 2003; 16:192-197.
36. Cristaudo A, Foddis R, Bonotti A, Simonini S, Vivaldi A, Guglielmi G, Bruno R, Landi D, Gemignani F, Landi S. Polymorphisms in the putative micro-RNA binding sites of mesothelin gene are associated with the serum levels of the mesothelin-related proteins. *Occup Environ Med*. 2010; 67:233-236.
37. Kimura N, Kimura I. Podoplanin as a marker for mesothelioma. *Pathol Int*. 2005; 55:83-86.

38. Ordoñez NG. D2-40 and podoplanin are highly specific and sensitive immunohistochemical markers of epithelioid malignant mesothelioma. *Hum Pathol.* 2005; 36:372-380.
39. Sienko A, Zander DS, Killen D, Singhal N, Barrios R, Haque A, Cagle PT. D2-40 is a novel new marker of malignant mesothelioma (MM): tissue microarray study of 45 MM versus 409 lung carcinomas and primary non-mesothelial neoplasms of the pleura and chest wall. *Mod Pathol.* 2005; 18:318A.
40. Okamura H, Kamei T, Mitsuno A, Hongo H, Sakuma N, Ishihara T. Localized malignant mesothelioma of the pleura. *Pathol Int.* 2001; 51:654-660.
41. Bretscher A, Edwards K, Fehon RG. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nature Rev.* 2002; 3:586-599.
42. Oury TD, Hammar SP, Roggli VL. Ultrastructural features of diffuse malignant mesotheliomas. *Hum Pathol.* 1998; 29:1382-1392.
43. Klune JR, Dhupar R, Cardinal J, Billiar TR, Tsung A. HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol Med.* 2008; 14:476-484.
44. Ge W-S, Fan J-G, Chen Y-W, Xu L-M. Expression and purification of functional HMGB1 A box by fusion with SUMO. *Mol Med Rep.* 2015; 12:6527-6532.
45. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009; 119:1420-1428.
46. Gheldof A, Berx G. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. *Prog Mol Biol Translat Sci.* 2013; 116:317-336.
47. Yao V, Platell C, Hall JC. Peritoneal mesothelial cells produce inflammatory related cytokines. *ANZ J Surg.* 2004; 74:997-1002.
48. Kuzyk A, Mai S. c-MYC-induced genomic instability. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014; 4: a014373.
49. Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, β -catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2009; 28:151-166.
50. Cortes-Dericks L, Carboni GL, Schmid RA, Karoubi G. Putative cancer stem cells in malignant pleural mesothelioma show resistance to cisplatin and pemetrexed. *Int J Oncol.* 2010; 37:437-444.
51. Ghani FI, Yamazaki H, Iwata S, Okamoto T, Aoe K, Okabe K, Mimura Y, Fujimoto N, Kishimoto T, Yamada T, Xu CW, Morimoto C. Identification of cancer stem cell markers in human malignant mesothelioma cells. *Biochem Biophys Res Comm.* 2011; 404:735-742.
52. Pouliquen DL, Nawrocki-Raby B, Ouacher A, Deleine C, Blandin S, Robard M, Birembaut P, Grégoire M. New prospects with curcumin in the treatment of mesothelioma: lessons from an orthotopic rat tumor model. In: *Curcumin. Synthesis, Emerging Role in Pain Management and Health Implications.* D. L. Pouliquen (ed.), Nova Science Publishers, Inc., New York, NY, USA, 2014, ISBN: 978-1-63321-319-7, pp 435-455.
53. Hwang H, Tse C, Rodriguez S, Gown A, Churg A. p16 FISH deletion in surface epithelial mesothelial proliferations is predictive of underlying invasive mesothelioma. *Am J Surg Pathol.* 2014; 38:681-688.
54. Jiang L, Akatsuka S, Nagai H, Chew SH, Ohara H, Okazaki Y, Yamashita Y, Yoshikawa Y, Yasui H, Ikuta K. Iron overload signature in chrysotile-induced malignant mesothelioma. *J Pathol.* 2012; 228:366-377.
55. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4:143-153.
56. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet.* 2006; 7:21-33.
57. Christensen BC, Houseman EA, Godleski JJ, Marsit CJ, Longacker JL, Roelofs CR, Karagas MR, Wrench MR, Yeh R-F, Nelson HH, Wiemels JL, Zheng S, et al. Epigenetic profiles distinguish pleural mesothelioma from normal pleura and predict lung asbestos burden and clinical outcome. *Cancer Res.* 2009; 69:227-234.
58. Chen B-F, Chan W-Y. The de novo DNA methyltransferase DNMT3A in development and cancer. *Epigenetics.* 2014; 9:669-77.
59. Liu F, Zhou Y, Zhou D, Kan M, Niu X, Zhang Z, Zhang D, Tao L, He L, Zhan L, Liu Y. Whole DNA methylome profiling in lung cancer cells before and after epithelial-to-mesenchymal transition. *Diagn Pathol.* 2014; 9: 66.
60. Valencia Antúnez CA, Taja Chayeb L, Rodríguez-Segura MA, López Álvarez GS, García-Cuellar CM, Villa Treviño S. DNA methyltransferases 3a and 3b are differentially expressed in the early stages of a rat liver carcinogenesis model. *Oncol Rep.* 2014; 32:2093-2103.
61. Lombaerts M, van Wezel T, Philippo K, Dierssen JW, Zimmerman RM, Oosting J, van Eijk R, Eilers PH, van de Water B, Cornelisse CJ, Cleton-Jansen AM. E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. *Br J Cancer.* 2006; 94:661-671.
62. Tan L, Shi YG. Tet family proteins and 5-hydroxymethylcytosine in development and disease. *Development.* 2012; 139:1895-1902.
63. Kristensen DG, Nielsen JE, Jørgensen A, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Almstrup K. Evidence that active demethylation mechanisms maintain the genome of carcinoma in situ cells hypomethylated in the adult testis. *Br J Cancer.* 2014; 110:668-678.
64. de Assis LV, Locatelli J, Isoldi MC. The role of key genes and pathways involved in the tumorigenesis of malignant mesothelioma. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1845:232-247.
65. Ko M, An J, Pastor WA, Koralov SB, Rajewsky K, Rao A. TET proteins and 5-methylcytosine oxidation in hematological cancers. *Immunol Rev.* 2014; 263:6-21.
66. Nakajima H, Kunimoto H. TET2 as an epigenetic master regulator for normal and malignant hematopoiesis. *Cancer Sci.* 2014; 105:1093-99.

67. Rawluszko-Wieczorek A, Siera A, Horbacka K, Horst N, Krokowicz P, Jagodzinski PP. Clinical significance of DNA methylation mRNA levels of TET family members in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015; 141:1379-92.
68. Murata A, Baba Y, Ishimoto T, Miyake K, Kosumi K, Harada K, Kurashige J, Iwagami S, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Yamamoto M, et al. TET family proteins and 5-hydroxymethylcytosine in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2015; Jun 8; PMID: 26093090. doi: 10.18632/oncotarget.4281.
69. Craighead JE, Akley NJ, Gould LB, Libbus BL. Characteristics of tumors and tumor cells cultured from experimental asbestos-induced mesotheliomas in rats. *Am J Pathol*. 1987; 129:448-462.
70. Gueugnon F, Leclercq S, Blanquart C, Sagan C, Cellerin L, Padieu M, Perigaud C, Scherpereel A, Grégoire M. Identification of novel markers for the diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Am J Pathol*. 2011; 178:1033-1042.
71. Im Y-S, Ryu Y-K, Moon E-Y. Mouse melanoma cell migration is dependent on production of reactive oxygen species under normoxia condition. *Biomol Ther*. 2012; 20:165-170.
72. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol*. 2001; 23:291-299.
73. Levan G. Nomenclature for G-bands in rat chromosomes. *Hereditas*. 1974; 77:37-52.

Annexe n°2 : Communications orales à des congrès nationaux et internationaux

- 1) Joëlle Nader, Nicolas Boisgerault, Carole Achard, Tiphaine Delaunay, Myriam Robard, Jean-François Fonteneau, Frédéric Tangy, Marc Grégoire, Daniel Pouliquen

Experimental models of malignant mesothelioma in mice and rats for evaluation of in vivo virotherapy

International Mesothelioma Interest Group (iMig) (Birmingham, Angleterre, Mai 2016)

- 2) Joëlle Nader, Boisgerault N, Panterne C, Deshayes S, Robard M, Grégoire M, Coqueret O, Guette C, Pouliquen DL

Experimental mesotheliomas in F344 rats: tools of investigation for basic research in oncoimmunology, diagnosis and evaluation of new therapeutic strategies

Journées scientifiques de l'école doctorale biologie santé (Oniris Nantes, France, Décembre 2015)

- 3) Joëlle Nader, Boisgerault N, Panterne C, Deshayes S, Robard M, Grégoire M, Coqueret O, Guette C, Pouliquen DL

Experimental mesotheliomas in F344 rats: tools of investigation for basic research in oncoimmunology, diagnosis and evaluation of new therapeutic strategies

Workshop "New Advances in animal Models and preclinical Imaging for translational Research in Cancerology" (La Turballe, France, Septembre-Octobre 2015)

Annexe n°3 : Posters présentés à des congrès nationaux et internationaux

- 1) Randa Belgacemi, Joëlle Nader, Jérôme Abadie, Alice Boissard, Marc Grégoire, Myriam Polette, Olivier Coqueret, Catherine Guette, Béatrice Nawrocki-Raby*, Daniel L. Pouliquen*
Involvement of LPP and septins in neoplastic transformation and acquisition of invasive properties in rat mesothelial carcinogenesis
The Epithelial-Mesenchymal Transition International Association (TEMTIA) (Houston, Etats Unis, 2017)
- 2) Floriane Briand, Joëlle Nader, Sophie Deshaies, Marc Grégoire, Daniel L. Pouliquen
Differential expressions of HIF1a, growth factors and cytokines related to EMT in an experimental biocollection of rat preneoplastic mesothelial cell lines.
The Epithelial-Mesenchymal Transition International Association (TEMTIA) (Houston, Etats Unis, 2017)
- 3) Joëlle Nader, Clarisse Panterne, Rana Chebbo, Tacien Petithomme, Chantal Combredet, Daniel Pouliquen, Jean-François Fonteneau, Frédéric Tangy, Marc Grégoire, Nicolas Boisgerault
Deletion Of The C Protein Improves The Oncolytic And Immunotherapeutic Potential Of Measles Virus
American Society of Gene & Cell Therapy (ASGCT) (Washington DC, Etats Unis, Mai 2017)
- 4) Joëlle Nader, Clarisse Panterne, Rana Chebbo, Chantal Combredet, Daniel Pouliquen, Jean-François Fonteneau, Frédéric Tangy, Marc Grégoire, Nicolas Boisgerault
Schwarz Measles Virus deleted for the C protein displays enhanced immuno-oncolytic properties
International Meeting on Replicating Oncolytic Virus Therapeutics (Vancouver, Septembre 2016)

- 5) Joëlle Nader, N.Boisgerault, C.Achard, T.Delaunay, M.Robard, J.F.Fonteneau, F.Tangy, M.Grégoire, D.L.Pouliquen

**MODELES EXPERIMENTAUX DE MESOTHELIOME MALIN HUMAIN
POUR L'ETUDE DE LA VIROTHERAPIE ANTI-TUMORALE IN VIVO**

10^{èmes} journées du Cancéropôle Grand Ouest (Sables d'Olonne, Juin 2016)

- 6) Joëlle Nader, Myriam Robard, Marc Grégoire, Daniel Pouliquen

Comparative analysis of 4 experimental mesotheliomas in F344 rats: a preliminary study of their tumor biology features

International Mesothelioma Interest Group (iMig) (Birmingham, Angleterre, Mai 2016)

Thèse de Doctorat

Joëlle NADER

Modèles précliniques d'étude du mésothéliome : application à l'évaluation de la virothérapie anti-tumorale *in vivo*

Experimental models of malignant mesothelioma for the evaluation of *in vivo* anti-tumoral virotherapy

Résumé

Au cours de ma thèse, j'ai travaillé sur deux sujets complémentaires. Le premier a concerné l'étude des interactions entre les cellules tumorales et leur microenvironnement, dans quatre modèles de mésothéliomes malins (MM) de rat. Les analyses histologiques du stroma, associées à des analyses protéomiques et de l'expression de différentes cytokines/chimiokines ont permis d'identifier trois stades d'invasivité croissante, associés à des modifications quantitatives de nombreuses protéines et à un infiltrat immunitaire décroissant. La tumeur la plus invasive a été caractérisée par une immunosuppression avec un profil moléculaire spécifique augmentant le potentiel métastatique. Le second sujet a concerné l'évaluation de l'efficacité de la virothérapie anti-tumorale, basée sur l'utilisation de la souche vaccinale du virus de la rougeole MV et de son variant MV- Δ C, pour le traitement du MM. Les deux virus ont induit des régressions tumorales chez des souris NOD SCID transplantées avec deux lignées de MM humains, le MV- Δ C amplifiant cet effet en induisant une mort cellulaire plus rapide, attestée par une réduction plus marquée de la masse tumorale. Ce potentiel apoptotique est associé, *in vitro*, à une production accrue du signal de danger HMGB1 et à la synthèse d'une grande quantité d'ARN double brin viral. Ces cellules infectées par le MV- Δ C sont aussi capables de favoriser la maturation des cellules dendritiques grâce à la réplication virale et à l'activation de Protéine Kinase R. Ce travail de caractérisation de nouveaux modèles immunocompétents et de nouvelles stratégies thérapeutiques permet d'envisager un meilleur traitement des patients souffrant de mésothéliome.

Mots clés

Mésothéliome – Modèles *in vivo* – Microenvironnement tumoral – Virothérapie – Virus de la rougeole (MV).

Abstract

As a PhD student, I worked in parallel on two complementary subjects. The first one concerned the study of the interactions between tumor cells and their microenvironment in four models of rat malignant mesothelioma (MM), differing in both their immune infiltrate and their metastatic potential. Histological analyses of stroma, together with proteomic analyses and expression of different cytokines, chemokines and growth factors, led us to the identification of three stages of increasing invasiveness, associated with quantitative changes in many proteins and a decreased immune infiltrate. The most invasive tumor was characterized by immunosuppression with a specific molecular profile increasing the metastatic potential. The second topic was the evaluation of the efficacy of anti-tumor virotherapy, based on the use of the Schwarz strain of measles virus (MV) and its variant MV- Δ C for the treatment of MM. Both viruses induced tumor regressions in NOD SCID mice transplanted with two human MM cell lines, but MV- Δ C amplified this effect by inducing faster cell death, as revealed by a marked reduction of the tumor mass. This apoptotic potential is associated, *in vitro*, with an increased production of the danger signal HMGB1 and the synthesis of a large amount of viral double-stranded RNA. These MV- Δ C-infected cells are also capable of promoting the maturation of dendritic cells through viral replication and activation of the Protein Kinase R. This characterization of new immunocompetent models and novel promising therapeutic strategies may lead to better clinical management of patients with mesothelioma.

Key Words

Mesothelioma - *In vivo* models - Tumor microenvironment - Virotherapy - Measles virus (MV).