



HAL
open science

Ciblage cellulaire spécifique de l'interféron α pour le contrôle des défenses immunitaires antitumorales

Thomas Ogor

► **To cite this version:**

Thomas Ogor. Ciblage cellulaire spécifique de l'interféron α pour le contrôle des défenses immunitaires antitumorales. Médecine humaine et pathologie. Université de Montpellier, 2022. Français. NNT : 2022UMONT001 . tel-03760542

HAL Id: tel-03760542

<https://theses.hal.science/tel-03760542>

Submitted on 25 Aug 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie-Santé

École doctorale CBS2

Unité de recherche UMR5235 LPHI

Ciblage cellulaire spécifique de l'interféron α pour le contrôle des défenses immunitaires antitumorales

Présentée par Thomas OGOR
Le 20 janvier 2022

Sous la direction de Gilles UZÉ
et Jean-François FONTENEAU

Devant le jury composé de

Sandra PELLEGRINI, DR, Institut Pasteur

Patrick CHAMES, DR, CRCM

Jonathan POL, CR, CRC

Javier HERNANDEZ, CR, IRMB

Présidente du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examinateur



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

À la mémoire de Joséphine et Tomás,

Remerciements

Je remercie tous les membres du jury, le Dr. Patrick Chames, le Dr. Jonathan Pol, le Dr. Sandra Pellegrini ainsi que le Dr. Javier Hernandez d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Je suis profondément reconnaissant du temps consacré à évaluer ma thèse et de leurs retours constructifs permettant d'améliorer la qualité de celle-ci.

Je remercie mon directeur de thèse, le Dr. Gilles Uzé de m'avoir accueilli dans son équipe depuis déjà plus de 4 ans. J'ai toujours respecté ton esprit critique, et tes connaissances encyclopédiques. Je suis reconnaissant de ton investissement tout au long de ma thèse et de m'avoir donné les outils nécessaires pour mener mon projet à bout.

Au Dr. Jean-François Fonteneau, mon co-directeur au sein du CRCINA, merci infiniment de m'avoir intégré au sein de l'équipe depuis maintenant plus de deux ans.. Tu as toujours su me motiver et me donner confiance en mes capacités de chercheur et dans mon projet. Merci également pour ton aide et tes conseils dans la rédaction de cette thèse - qui n'a pas dû être un exercice facile pour vous tous également. « Si bien » cette page se termine je garde nos discussions précieusement dans ma mémoire.

Merci également aux membres de mon comité de thèse, le Dr. Sandra Pellegrini et le Dr. Javier Hernandez (vous méritez un doublon dans mes remerciements). Vous avez suivi mes progrès tout au long de cette thèse, et vos retours et discussions lors des évaluations annuelles ont enrichi mes connaissances et aiguisé mon sens critique.

A tout le LPHI de Montpellier. Notre secrétariat de compétition, Valérie, Nathalie, Christine, Gaëlle et Simon merci énormément pour votre patience, votre aide administrative et votre bonne humeur. À « l'aile droite » du LPHI, Alexandra, Cathy, Stéphane, Richard, Laure, Charlotte, Étienne, je vous remercie de tous ces moments, ces discussions autour d'un café, de ces fous rires. Mention spéciale à vous Yann et Gèneviève, vous m'avez appris tant de choses que la longueur de cette liste servirait à faire une thèse en soit, et je vous en remercie du fond du cœur. Merci aux « anciennes » étudiantes Tamara et Julija, et de tous ce moments de complicité et

plaisanteries (et quelques soirées). Je voulais remercier également le Dr. Georges Lutfalla, directeur du LPHI de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et d'avoir toujours laissé sa porte ouverte quand j'en avais besoin. Un grand merci également à toutes les personnes du LPHI que je n'ai pas pu citer ou nommer dans cette très longue liste.

À « lékip katr » du CRCINA, ma nouvelle famille nantaise. Tina, Nico, Lucas, Tacien, Marion, Maureen, Ugo, Camille, Morgane, Myr... Morgane, Margot, Pierre, Vivi, Sophie, Judith, Marine, Christophe, Delphine, je serai marqué à jamais par le sens de la camaraderie que j'ai pu vivre auprès de vous (ainsi que par votre qualité de production cinématographique pour les vidéos de thèse). Grâce à vous je me suis épanoui non seulement comme scientifique, mais comme personne aussi. Un grand merci également au Dr. Marc Grégoire, directeur du CRCINA et chef de l'équipe 4, pour son accueil et soutien depuis mon arrivée au sein de son laboratoire.

Un grand merci également aux plateformes de cytométrie MRI de Montpellier et Cytocell de Nantes. Votre expertise et vos conseils m'ont beaucoup aidé lors de mes longues sessions de FACS.

A ma nouvelle famille, spécialement Bruno et Claude Berruyer, qui m'a accueilli comme un des leurs - et qui m'a aidé pour la correction de la thèse. Je vous serai toujours reconnaissant pour tout ce que vous avez fait pour moi.

À Lucile, ma source de jouvence. Tu m'as accompagné pendant toutes ces années, à travers les meilleurs moments, et ceux un peu plus difficiles. Ton soutien et ton sourire m'ont permis de maintenir le cap et d'arriver jusqu'au bout (enfin !).

À ma famille. Votre soutien et amour inconditionnel m'ont permis de bâtir le chemin sur lequel je me trouve à présent. Une vie entière ne suffirait pas à vous remercier de tout ce que vous avez fait pour moi, tout ce que vous m'avez appris. Ma mère Françoise, ma tante Béatrice, mon père de cœur Jorge, ma grande cousine Sabine, ainsi que ceux qui ne sont plus parmi nous - je pense à toi Joséphine, ma grand-mère adorée et à toi Tomás, mon héros à jamais, merci.

Contenu

Glossaire.....	4
1 Préface.....	6
2 La Réponse IFN de type I	8
2.1 Senseurs de dangers	8
2.1.1 Les Récepteurs Toll-Like.....	9
2.1.2 Axe cGAS/STING.....	9
2.1.3 Les « RIG-I like receptors » (RLR)	10
2.1.4 Induction de la réponse IFN de type dans le cancer	10
2.2 Les IFNs de type I.....	14
2.2.1 IFN- α	15
2.2.2 IFN- β	16
2.2.3 Affinité des IFNs pour leur récepteurs	16
2.3 IFNAR, le récepteur des IFN de type I	16
2.3.1 Structure de IFNAR	17
2.3.2 Activation et signalisation d'IFNAR	18
2.3.3 Interactions IFNs de type I avec IFNAR	19
2.3.4 Régulation négative de la réponse IFN de type I	20
2.4 IFNs de type III.....	22
2.5 Activités des IFNs de type I	23
2.5.1 Activités antivirales de la réponse IFN de type I.....	23
2.5.2 Modulation de la réponse immunitaire.....	28
2.5.3 Toxicité des IFNs de type I.....	32
2.5.4 Interféronopathies	33
2.6 L'ampleur des défauts de la réponse IFN dans le cancer	33
3 Les anticorps comme outils de ciblage	35
3.1 La structure des anticorps	35
3.2 Les anticorps bispécifiques	37
3.3 Les nanobodies.....	38
3.3.1 La structure des nanobodies	39
3.3.2 Application en thérapie	39
3.4 Les immunocytokines	40
3.5 Criblage d'anticorps par la technique de phage display	41
4 L'immunothérapie oncolytique	43
4.1 Historique de l'oncolyse virale comme traitement du cancer.....	43

4.2	Exploitation des propriétés spécifiques aux cellules tumorales par les virus oncolytiques.....	44
4.3	L'oncolyse virale moderne.....	47
4.4	Mécanisme de l'immunothérapie oncolytique :	51
4.5	Les IFNs de type I, une lame à double tranchant dans l'oncolyse virale	53
5	Manipulation de la voie IFN de type I	55
5.1	Historique de la Neutralisation des IFN de type I	55
5.2	Activation de la signalisation IFNAR dans un type cellulaire particulier	57
5.2.1	Inhibition de la signalisation d'IFNAR dans un type cellulaire particulier	59
6	Objectifs.....	60
	Résultats. Article : A tumor-targeted interferon-alpha/-beta receptor 1 antagonist increases replication of the vesicular stomatitis virus in a mouse mesothelioma model	61
7	Résultats Complémentaires.	103
1.	L'antagoniste ciblée ne neutralise pas IFNAR en « trans »	103
2.	Stabilité de l'activité de neutralisation <i>in vivo</i> d'antagonistes ayant un linker PASylée	104
3.	Persistance de l'expression de hCD20 dans la lignée AK7 hCD20 <i>in vivo</i>	105
4.	Obtention d'une lignée d'AK7 hCD20 stable	106
5.	La lignée AK7 hCD20 n'est pas sensible à l'IFN-λ.....	107
6.	Etude <i>in vivo</i> de la sensibilité au VSV des cellules AK7 n'exprimant pas IFNAR.....	108
7.1.1	Génération de lignées AK7 IFNAR1 _{KO}	108
7.1.2	Effet thérapeutique du VSV dans des tumeurs AK7 IFNAR1 _{KO} <i>in vivo</i>	109
8	Matériel et méthodes complémentaires.....	111
8.1	Expression de PD-L1 dans les co-cultures de B16 mCD20 et B16 hCD20	111
8.2	Neutralisation de l'expression d'ISG54 dans des splénocytes.....	111
8.3	Stimulation de cellules avec un IFN de type III	111
8.4	Obtention d'une lignée AK7 IFNAR1 _{KO}	111
8.5	Marquage et cytométrie de flux	112
8.6	Traitement des tumeurs AK7 IFNAR1 _{KO} avec le VSV	112
8.7	Test d'immunisation contre les tumeurs AK7 WT.....	112
9	Discussion	113
9.1	Naviguer entre Scylla et Charybde	113
9.2	L'avantage de notre stratégie de ciblage	113
9.3	Le résultat de la combinaison VSV/antagoniste ciblée peut varier selon le statut de la réponse IFN des cellules tumorales	115

9.4	Comment expliquer le manque d'efficacité de notre traitement.....	116
9.5	Perspectives du projet	119
9.6	La versatilité de cette stratégie de ciblage peut être utile sur d'autres cibles	120
10	Conclusions.....	123
11	Bibliographie.....	124

Glossaire

ADCC	Cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps	CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
ADN	Acide désoxyribonucléique	CTL	Lymphocytes T cytotoxiques
ADNmt	ADN mitochondrial	DAMP	Motif moléculaire associé aux dégâts
APC	Cellule présentatrice d'antigènes	DC	Cellule dendritique
ARN	Acide ribonucléique	DISC	Complexe de signalisation induisant la mort cellulaire
ARNdb	ARN double brin	cGAS	Synthase de GMP-AMP cyclique
ARNsb	ARN simple brin	FADD	Domaine de mort associé à la protéine FAS
ARNt	ARN de transfert	FNIII	Fibronectine de type III
ASLV	Virus du sarcome aviaire	FPPS	Synthase farnesyl diphosphate
ATM	Kinase de l'ataxie-télangiectasie mutée	Gag	Glycosaminoglycane
ATP	Adénosine triphosphate	GM-CSF	Facteur stimulant des colonies de granulocytes et de macrophages
CAR T-cell	Lymphocyte T à récepteur d'antigène chimérique	HcAbs	Anticorps de camélidés
CARD	Domaine d'activation recrutement de caspases	HCV	Virus de l'hépatite C
CD	Cluster de différenciation	HERV	Rétrovirus endogènes humain
cDC	DCs conventionnelles	HPV	Papillomavirus humain
CDK	Kinase dépendante de cyclines	HSV	Virus de l'herpès simple
ESCRT	Complexe de tri endosomal nécessaire au transport	IAV	Virus de l'Influenza A
CKI	Inhibiteur de CDK	IFNAR	Récepteur interférons de type I
CDR	Régions déterminantes de complémentarité	IFIT	Protéines induites par l'IFN avec un domaine tetraticopéptide
cGAMP	GMP-AMP cyclique	IFITM	Protéine transmembranaire induite par l'IFN

IFN	Interféron	pDC	DCs plasmacytoïde
IRF	Facteur de régulation des interférons	PKR	Protéine kinase ARNdb-dépendante
ISG	Gène stimulé par les interférons	RIG	Gène induit par l'acide-rétinoïque
JSRV	Virus de Jaagsiekte	RLR	Récepteur (RIG-1)-like
LES	Lupus systémique érythémateux	ScFv	Fragment variable de chaîne simple
LMC	Leucémie myéloïde chronique	STING	Protéine stimulatrice des gènes de l'interféron
LPS	Lipopolysaccharides	TCGA	« The Cancer Genome Atlas »
mAb	Anticorps monoclonaux	TCR	Récepteur de cellules T
MARV	Virus de Marburg	Th	Lymphocytes T CD4+ "helpers"
MCMV	Cytomégalovirus de souris	TIL	Lymphocytes infiltrants de la tumeur
MOMP	Perméabilisation de la membrane externe des mitochondries	TIR	Domaine du récepteur Toll-interleukine I
MPM	Mésothéliome pleural malin	TK	Thymidine kinase
MV	Virus de la rougeole	TLR	Récepteur Toll-like
NDV	Virus de la maladie de Newcastle	TRAIL	Ligand inducteur de l'apoptose lié au TNF- α
NK	Cellules "Natural-Killer"	Treg	Lymphocytes T CD4+ régulateurs
OAS	Olygoadenylate synthase	VHH	Fragment variable simple de chaîne lourde, nanobody
PAMP	Motif moléculaire associé aux pathogènes	VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
PARP	Polymérase poly-ADP-ribose	VSV	Virus de la stomatite vésiculaire

1 Préface

La survie de l'organisme est au cœur de ce qui motive la construction de la vie telle qu'on la connaît : la survie par l'obtention de nutriments nécessaires pour effectuer nos fonctions biologiques essentielles, la survie par la reproduction et la transmission de notre matériel génétique, mais également, la survie par la défense contre les éléments capables de nuire à notre santé. Des millions d'années d'évolution ont permis l'apparition de mécanismes de défenses immunitaires capables de nous préserver d'agents externes, et internes, responsables de nombreuses pathologies. Un de ces mécanismes immunitaires est le système interféron (IFN).

Ces cytokines pro-inflammatoires pléiotropiques qui doivent leur nom à leur capacité à interférer avec la réplication virale sont impliquées dans de nombreux mécanismes de défense. La détection de signaux de danger provenant de pathogènes viraux ou bactériens déclenche l'expression et la libération d'IFN de type I notamment l'IFN- β et les IFN- α (Figure 1). Ceux-ci peuvent agir de manière paracrine ou autocrine, en activant le récepteur des IFN de type I (IFNAR), un hétéromère ubiquitaire constitué par deux chaînes : IFNAR1 et IFNAR2. L'interaction des IFN avec les sous-unités entraîne à leur tour la dimérisation du récepteur et l'expression des « Interferon Stimulated genes » (ISG) responsables des activités antivirales, antibactériennes et antitumorales de ces cytokines (Figure 1).

Mon travail de thèse a consisté à produire et évaluer des antagonistes ciblés pour inhiber l'activation d'IFNAR par les IFN de type I sur un type cellulaire particulier. J'ai ensuite évalué si ces antagonistes ciblés vers le récepteur IFNAR des cellules tumorales pouvaient être utilisés pour augmenter la réplication de virus oncolytiques dans les tumeurs.

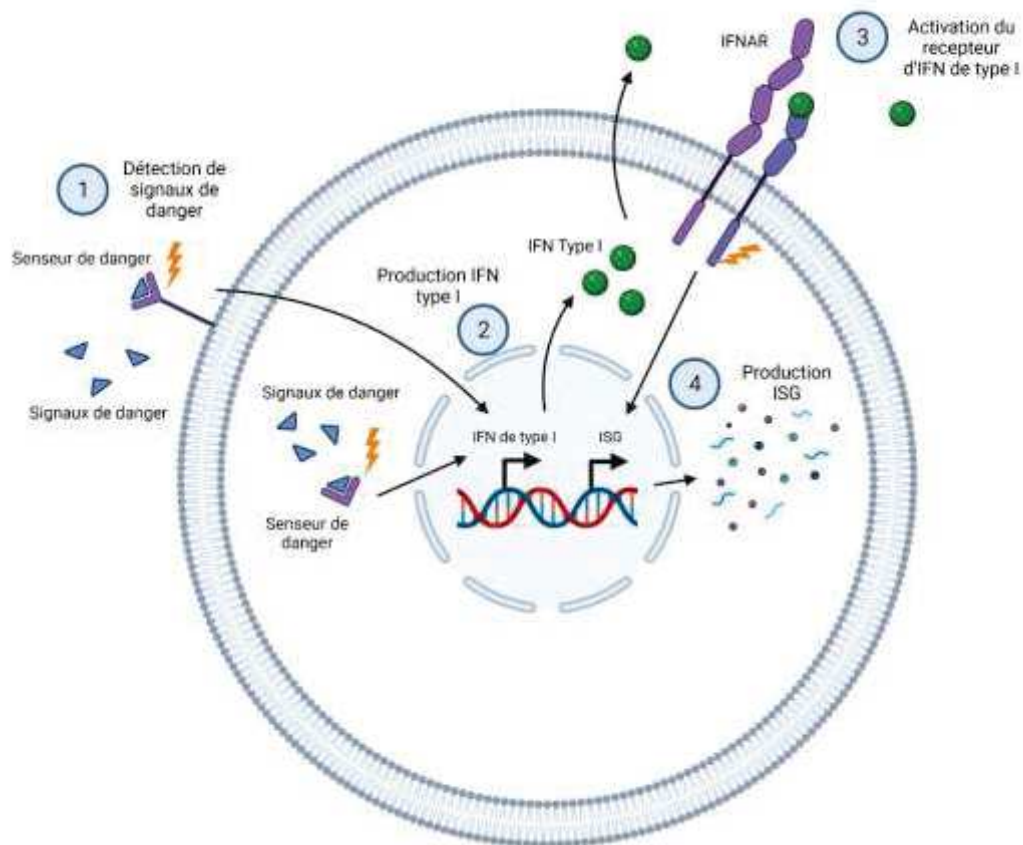


Figure 1 La réponse IFN de type I. Toute cellule est capable de détecter des dangers d'origine microbien et dû aux dégâts cellulaires, induisant l'expression des IFN de type I, qui agiront de manière autocrine et paracrine, induisant l'expression d'ISG.

2 La Réponse IFN de type I

2.1 Senseurs de dangers

Au cours de l'évolution, la réponse immunitaire innée est devenue un allié précieux dans la survie des organismes complexes. La réponse IFN est étroitement impliquée dans la mise en place des défenses immunitaires contre les différents dangers auxquels notre organisme fait face.

Afin de déclencher cette réponse IFN, les cellules de notre organisme sont armées de divers senseurs de dangers connus sous le nom de « pattern recognition receptors » (PRR). Différents signaux sont reconnus : ADN mitochondrial, matériel génétique viral, matériel génétique bactérien, matériel génétique des cellules tumorales (Figure 2). Tout cela permet une réponse rapide face aux différents dangers.

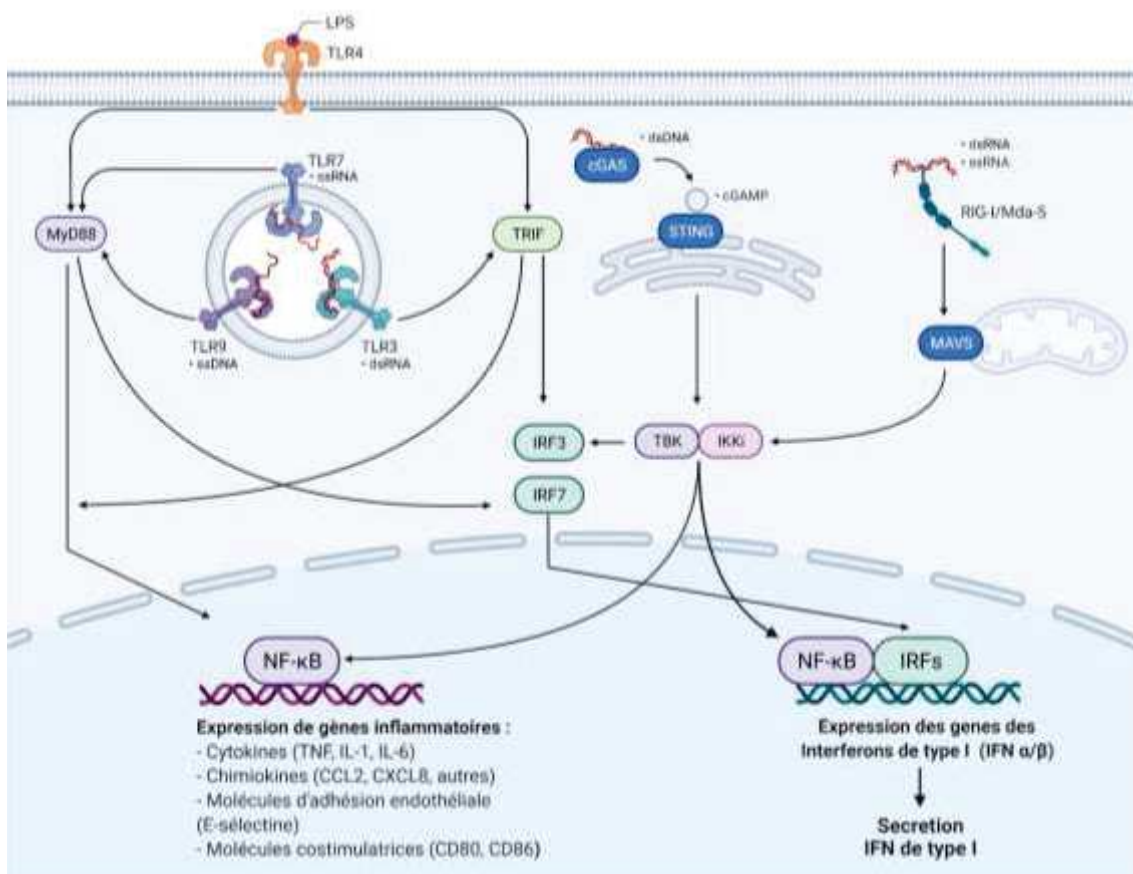


Figure 2 Déclenchement de la réponse IFN de type I. Afin de déclencher la réponse IFN, de nombreux senseurs de dangers sont capables de détecter des motifs moléculaires associés aux microbes (MAMP). Cela provoque une cascade de signalisation qui conduit à la phosphorylation d'IRF3, de NF-κB et dans certains cas d'IRF7 ce qui provoque la sécrétion d'IFN de type I, mais aussi de nombreuses chimiokines

2.1.1 Les Récepteurs Toll-Like

Les récepteurs Toll-Like (TLR) sont des protéines transmembranaires de la famille des « pattern recognition receptors » capables de détecter des motifs moléculaires associés aux microbes (MAMP). Ces récepteurs sont surtout exprimés par les cellules immunitaires, ainsi que les cellules épithéliales [1]. Certains de ces récepteurs se trouvent à la membrane des cellules, tel que le TLR4, capable de répondre aux lipopolysaccharides bactériens (LPS) [2]. D'autres, tels que les TLR3, TLR7 et TLR9 se trouvent dans le compartiment endo-lysosomal. Les TLR3 et TLR7 peuvent détecter respectivement des ARN double brin ou ARN simple brin provenant de la phagocytose. Quant au TLR9, il est capable de détecter du matériel génétique exogène contenant des îlots CpG non méthylés, présents dans les pathogènes comme les virus et bactéries [2–4].

Suite à l'activation de ces récepteurs, les TLR recrutent des adaptateurs contenant des motifs TIR tel que MyD88 [1,4]. Ce recrutement induit l'activation de la voie NF- κ B, des MAP kinases, des IRF-7, IRF-3 et IRF-5, provoquant l'induction de cytokines pro-inflammatoires tels que les IFN de type I et donc des activités antibactériennes et antivirales qui en dérivent [3,5].

2.1.2 Axe cGAS/STING

La voie cGAS/STING est un autre composant de ces mécanismes de détection de dangers qui conduisent à la production d'IFN de type I. Cette voie est présente dans toutes les cellules nucléées. La fixation d'ADN double brin à la synthase cGAS, entraîne la production de dinucléotides cycliques (CDN) cGAMP. A son tour, cGAMP est reconnu par la protéine stimulatrice de gènes de l'interféron (STING), entraînant son activation [6–8]. Suite à cette activation, STING est en mesure de former un complexe avec la kinase TANK-binding (TBK1). Ce complexe, peut ensuite s'incorporer dans des structures péri nucléaires, ressemblant des autophagosomes, capables de se trans-localiser aux endosomes. S'en suit une phosphorylation d'IRF3 et NF- κ B entraîne une induction de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 β et les IFN de type I [7].

2.1.3 Les « RIG-I like receptors » (RLR)

Un autre mécanisme de détection de matériel génétique pathogène qui est présent dans toutes les cellules repose sur les récepteurs (RIG-I)-like (RLR) capables de reconnaître les virus à ARN. Les RLR sont une famille de protéines constituées d'un domaine hélicase, d'un domaine CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain), et d'un domaine répresseur contrôlant leur activation [9,10]. Dans cette famille de senseurs antiviraux, on trouve les protéines RIG-I, LGP2 et MDA5. Ces senseurs sont spécialisés dans la détection d'ARN double brins et d'ARN simple brin contenant des motifs poly-U/UC ainsi que des séquences riches en uracil/adénine souvent retrouvées dans de nombreux virus [9]. L'activation des RLR entraîne l'activation des protéines MAVS à la surface des mitochondries, induisant la phosphorylation et la relocalisation nucléaire d'IRF3, IRF7 et NF- κ B qui induiront par la suite l'expression des IFN de type I et de type III ainsi que de nombreux gènes de défense antivirale et pro-inflammatoire [11].

2.1.4 Induction de la réponse IFN de type I dans le cancer

Le cancer est un ensemble de pathologies caractérisées par un dysfonctionnement des fonctions normales de la cellule. De manière similaire à la réponse antivirale, la réponse IFN I dans le cancer est modulée par la détection d'ARN ou d'ADN tumoral par les différentes voies décrites plus tôt (Figure 3) [12,13]. Suite à l'activation de la voie IFN, à travers les divers senseurs de dangers, l'action autocrine et paracrine des IFN de type I induit des mécanismes de défenses antitumorales.

2.1.4.1 Détection de l'ADN du noyau dans le cytoplasme

L'instabilité génomique des cellules tumorales est un phénomène essentiel pour la progression de la maladie. Les cellules de notre organisme possèdent des protéines suppresseur de tumeurs capables de réguler le cycle cellulaire et de réparer des dommages à l'ADN. Ces facteurs suppresseurs de tumeurs, tel que TP53, sont souvent altérés dans les cellules tumorales et provoquent cette instabilité génomique. A cause de ce dérèglement du cycle cellulaire des cellules tumorales, il est commun d'observer une accumulation d'ADN double brin ainsi que de micronoyaux dans le cytoplasme, qui peut conduire à l'activation de la voie STING. La voie STING est donc à l'épicentre de la réponse au danger associé au dommage de l'ADN [14]. L'activation de STING dans les

cellules tumorales implique la détection de l'ADN cytosolique à travers le senseur cGAS, induisant la production de cGAMP [15]. Cependant, d'autres voies d'activation cGAS-indépendantes ont été décrites. La détection de dommage à l'ADN par la kinase ATM et l'enzyme PARP induit la phosphorylation de p53 et l'activation d'un complexe ubiquitin ligase dans le cytosol. La protéine p53 phosphorylée peut interagir avec le senseur de l'ADN IFI16 et sortir du noyau vers le cytosol. Une fois dans le cytoplasme, l'interaction d'IFI16 avec STING ubiquitiné induit l'activation de NF- κ B et la sécrétion des IFN de type I [16].

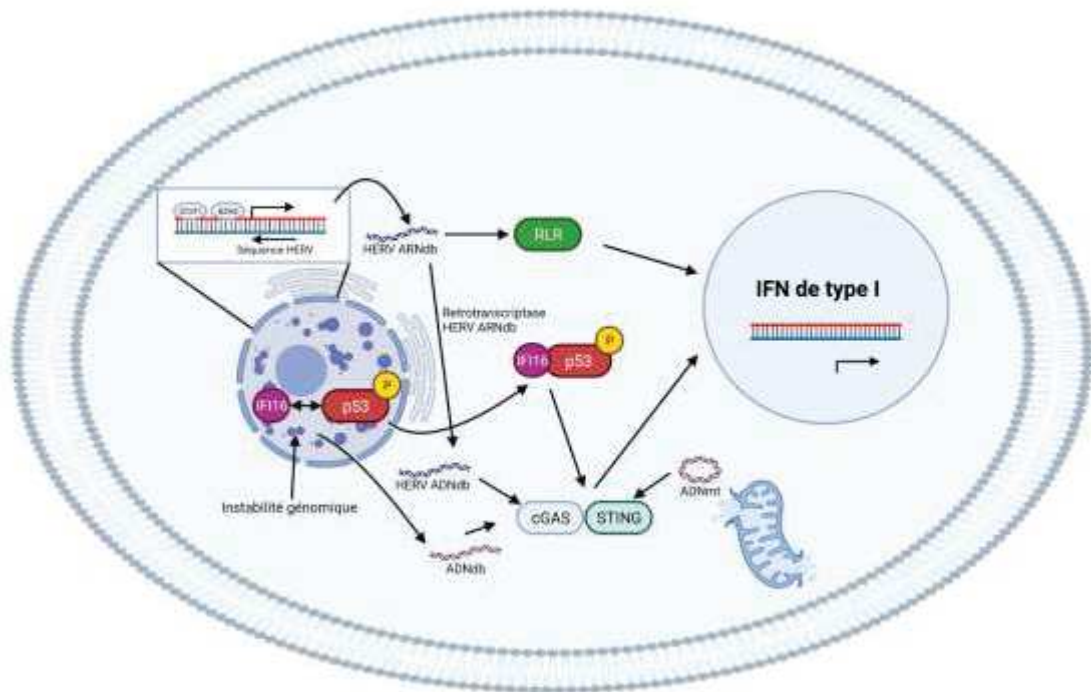


Figure 3 Les défauts dans la physiologie cellulaire causées par la progression tumorale déclenche la libération d'IFNs de type I grâce aux senseurs de dangers impliqués dans cette réponse.

2.1.4.2 Détection de l'ADN mitochondrial dans le cytoplasme

L'ADN du noyau n'est pas la seule source de DAMP susceptible d'activer la réponse IFN de type I lors de la transformation cancéreuse d'une cellule. Les mitochondries sont un excellent biomarqueur de dommages cellulaires, à la ressemblance de l'ADN mitochondrial (ADNmt) à l'ADN d'origine bactérien dans son contenu de motifs CpG hypométhylés [17].

Afin d'éviter la transformation de cellules somatiques en cellules cancéreuses, les mécanismes d'induction de l'apoptose sont activés suite à des dommages de l'ADN. Par un phénomène de perméabilisation de la membrane externe des mitochondries (MOMP) le contenu de ces organelles est versé dans le cytoplasme, libérant un cocktail de facteurs pro-apoptotiques, ainsi que de l'ADNmt [7,18–20]. Suite à la libération d'ADNmt dans les cellules cancéreuses, et de transfert horizontal d'ADNmt dans les cellules somatiques, la voie cGAS/STING est capable de détecter ce matériel génétique et d'induire la libération de cytokines pro-inflammatoires [21,22].

2.1.4.3 Détection de rétrovirus endogènes.

Au fur et à mesure de l'évolution des vertébrés, le contact avec des agents viraux a permis l'inclusion de matériel génétique viral dans notre génome. Environ 8% de notre génome est suspecté d'être d'origine virale, sous l'appellation de rétrovirus endogènes humains (HERV) [23,24]. Ce matériel génétique a apporté des nouveaux gènes à notre espèce, enrichissant la machinerie cellulaire avec une multitude d'éléments régulateurs impliqués dans la plasticité et le développement de l'organisme.

Ces HERV sont souvent peu exprimés dans les cellules saines, maintenus silencieux par des mécanismes épigénétiques comme la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones. Avec la remodelisation épigénétique qui a lieu dans les cellules tumorales, les HERV peuvent alors être exprimés, notamment sous la forme d'ARN double brin.

De nombreux types de tumeurs sont enrichies en ARNdb de HERV, pouvant être utiles comme biomarqueurs tumoraux [25]. Certaines de ces gènes d'HERV se trouvent en antisens dans des régions régulées par des protéines STAT1 et EZH2 [26]. L'expression de ces gènes à travers des processus inflammatoires provoque l'accumulation d'ARNdb dans le cytoplasme de la cellule qui sont détectés par les RLR, RIG I et MDA5 et conduisent à l'expression de cytokines pro-inflammatoires dont les IFN de type I. Par une activité rétrotranscriptase, ces ARN peuvent être transformés en ADNdb, activant à leur tour la voie cGAS-STING [26,27].

Les séquences HERV sont aussi traduites en différentes protéines et enzymes. La réponse immunitaire suite à la détection de ces éléments est médiée par divers types

de TLR, exprimés dans des cellules effectrices de la réponse immunitaire innée et adaptative [28].

Suite à l'activation de ces voies de détection de PAMP, les cellules immunitaires et tumorales sont en mesure de produire des IFN de type I, agissant dans le stroma tumoral ainsi que par voie systémique.

2.1.4.4 Induction de la réponse IFN de type I suite aux traitements antitumoraux

La réponse IFN de type I peut être également déclenchée par les traitements contre le cancer, étant étroitement impliquée dans leur efficacité.

Les dommages aux cellules tumorales induits par les traitements radiothérapeutiques et chimiothérapeutiques classiques induisent la libération de DAMP [29–31]. Certains traitements chimiothérapeutiques peuvent également provoquer l'expression de séquences d'HERV [32]. Des thérapies plus récentes comme l'oncolyse virale peuvent également induire cette réponse IFN par le biais de leur nature virale et par la libération de DAMP suite à la lyse des cellules cancéreuses [33–37].

Cette induction de la réponse IFN de type I par le biais de DAMP et d'antigènes tumoraux et viraux, est clé dans la réponse antitumorale [31,38,39]. En effet, cette association d'antigénicité et d'adjuvantité favorise le recrutement d'APC et l'activation des réponses immunitaires adaptatives nécessaires à la destruction de la tumeur et le contrôle de l'infection virale.

2.2 Les IFN de type I

La découverte des IFN de type I remonte à plus de 60 ans. Isaacs et Lindenman pendant leurs études sur le virus Influenza, arrivèrent à inhiber la réplication virale suite à l'administration préalable de virus inactivé par traitement thermique (Figure 4). Ainsi, ils décrivent un nouveau facteur soluble capable « d'interférer » avec la réplication du virus[40]. D'autres recherches contemporaines de l'époque, à l'Université de Tokyo, appuyèrent l'existence de facteurs d'inhibition virale suite à l'administration de virus atténués[41,42].

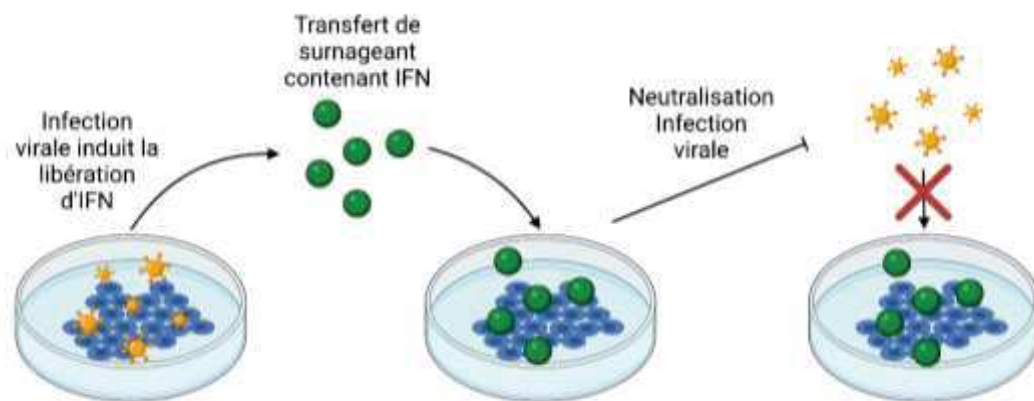


Figure 4 L'infection virale déclenche la libération des IFN de type I. Ces cytokines sont capables d'inhiber la réplication virale et organiser une réponse immunitaire capable de détruire les cellules infectées.

En 1976, Cantel et al. utilisèrent de l'IFN partiellement purifié, obtenu à partir du traitement de lésions cutanées provoquées par le virus de l'herpès [43]. Quelques années plus tard, en 1978, l'équipe de Y. Tan produisit et purifia l'IFN β humain à partir de fibroblastes humains, purifiant pour la première fois un IFN de type I humain [44]. Les IFN α furent à leur tour purifiés par le laboratoire de Sidney Pestka, décrivant dans leurs travaux de 1978 à 1981 une collection d'IFN humains issus de leucocytes actifs sur des cellules humaines et bovines, dont différents sous-types d'IFN α faisaient partie [45,46].

Les IFN de type I appartiennent à la superfamille de cytokines hélicoïdales, dans lequel nous trouvons d'autres membres comme GM-CSF, IL-2, IL-5 ou l'IFN- γ [47]. La structure des IFN de type I est caractérisée par 5 hélices α (A, B, C, D et E) disposées en forme de cylindre, cette structure étant conservée parmi les différents types d'IFN de type I dans différentes espèces [48] (Figure 5). Malgré une structure géométrique similaire entre les IFN de type I, seulement 32% de la séquence entre l'IFN α et l'IFN β est conservée, correspondant au « barillet » de la protéine et à certains résidus impliqués dans l'interaction de ces cytokines avec les sous-unités du récepteur IFNAR [49,50].

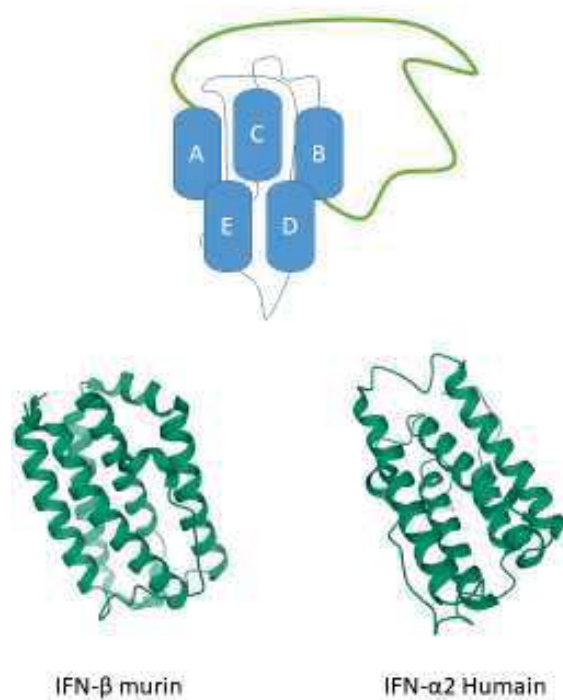


Figure 5 Structure tridimensionnelle des IFN de type I. Les 5 hélices α , représentées par les cylindres bleus, sont disposées en forme cylindrique et reliées par des boucles protéiques. La boucle A-B, est colorée en vert. En dessous, deux structures cristallographiques obtenues de la base de données RCSB PDB. IFN- β murin : 1WU3 ; IFN- α 2 humain : 1TF3.

Chez les mammifères, cette famille de cytokines aux activités pléiotropes est formée par différents sous- types d'IFN α , l'IFN- β et d'autres types minoritaires (IFN ϵ , IFN κ et IFN ω).

2.2.1 IFN- α

Les IFN alpha constituent la plus grande famille d'IFN de type I, avec 13 membres chez l'homme et 14 chez la souris. Ces cytokines sont formées par 161-167 acides-aminés (165 pour l'IFN α 2 humain), conservant 80% de leur séquence parmi les différents sous- types. Tous les sous- types d'IFN α conservent les quatre cystéines impliquées dans la formation de deux ponts disulfures [51]. Chez l'homme, les IFN α sont codés par 13 gènes fonctionnels non-alléliques situés dans le chromosome 9 [52]. Dans le cas des souris, 14 gènes situés dans le chromosome 4 codent pour les 14 protéines IFN α [51,53].

2.2.2 IFN- β

Un autre représentant des IFN de type I est l'IFN β , une cytokine de haute affinité capable d'induire une réponse IFN rapide. Cette protéine est codée par un seul gène dans le chromosome 9 chez l'homme. Elle est également formée par une séquence de 166 acides-aminés. A la différence d'autres IFN de type I, l'IFN- β ne contient qu'un pont disulfure entre les cystéines 29 et 138 [52,54].

2.2.3 Affinité des IFN pour leurs récepteurs

Les IFN de type I étant capables d'interagir avec les deux sous-unités d'IFNAR, nous pouvons identifier deux composantes : l'affinité pour la sous-unité IFNAR2 et l'affinité pour la sous-unité IFNAR1.

Les IFN de type I présentent une forte affinité pour IFNAR2. Les rangs d'affinités varient selon le type, cependant nous retrouvons des K_D de l'ordre du nM. Chez l'homme, parmi les sous-types d'IFN- α , nous trouvons des K_D pouvant aller de 0,4 nM pour l'IFN- α 10, à 1,7 nM pour IFN α 2, et jusqu'à 200 nM pour IFN- α 1 [55]. Cette affinité est nettement plus élevée dans le cas de l'IFN- β , présentant une K_D inférieure de l'ordre de 0,1 nM [56,57].

Quant à la fixation au domaine ectotopique d'IFNAR1, l'ordre d'affinité est nettement plus faible. Par exemple, dans le cas de l'IFN- β , l'affinité pour IFNAR1 est 500 fois plus faible en comparaison avec une K_D de 50 nM. Cette différence est encore plus prononcée chez les IFN- α . Leur affinité pour IFNAR1, représentée par des K_D de l'ordre de 0,5-5 μ M, rend la fixation IFN-IFNAR1 extrêmement peu favorable [53,56]. La formation du complexe IFN-IFNAR2 devient donc essentielle pour stabiliser la réaction de dimérisation.

2.3 IFNAR, le récepteur des IFN de type I

Le récepteur des IFN-a/-b (IFNAR) est un hétérodimère appartenant à la famille des récepteurs de cytokines de classe II. Exprimé sur toute cellule de notre organisme, il est constitué par deux protéines transmembranaires, IFNAR1 et IFNAR2, clonées pour la première fois dans les années 1990 [58,59].

2.3.1 Structure de IFNAR

2.3.1.1 *IFNAR2*

La sous-unité transmembranaire IFNAR2, est constituée par trois principaux domaines : l'ectodomaine responsable de la fixation des IFN de type I, d'un domaine transmembranaire, et d'un domaine intracellulaire interagissant avec des Janus kinases responsables de la cascade de phosphorylation induite par l'activation d'IFNAR.

Le domaine ectotopique d'IFNAR2 est formé par deux modules « FNIII-like » (Fibronectin type III) chacun formé par sept feuilletts β nommés sous-domaines D1 et D2 [60]. Les sous-domaines D1 et D2 sont impliqués dans l'interaction avec les IFN de type I.

Le domaine intracellulaire d'IFNAR2, peut varier en longueur, présentant un isoforme long fonctionnel, IFNAR2c (de 486 acides-aminés de domaine intracellulaire), et deux formes courtes : IFNAR2b avec 67 acides-aminés de domaine intracellulaire, et IFNAR2a, une forme soluble d'IFNAR2 manquant de domaine transmembranaire et cytoplasmique [61]. Il est capable d'interagir spécifiquement avec Jak1 à travers une région des résidus 300-346 contenant un domaine FRM-SH2 [62]. L'activité de phosphorylation de Jak1 à travers IFNAR2 est nécessaire, à son tour, pour l'activation de STAT1 et la transduction du signal.

2.3.1.2 *IFNAR1*

La structure de la sous-unité IFNAR1 présente trois domaines: un domaine extracellulaire, impliqué dans l'interaction avec le complexe IFNAR2-IFN, un domaine transmembranaire, et un domaine intracellulaire, capable d'interagir avec les kinases Janus et de permettre le « docking » des protéines STAT.

Le domaine extracellulaire est constitué par quatre régions FNIII-like formées, à leur tour, par sept feuilletts β chacune. Chaque module FNIII compose les 4 sous-domaines (SD) de l'ectodomaine, à la différence de la sous-unité IFNAR2 qui est composée de 2 sous-domaines [60,63,64]. La fixation du complexe IFNAR2-IFN à IFNAR1 est possible grâce à l'interaction avec les domaines N-terminal SD1, SD2 et SD3 d'IFNAR1. Le domaine SD4 étant d'utilité pour l'orientation d'IFNAR1 lors de la fixation [65].

Quant aux domaines intracellulaires, les régions en C-terminal d'IFNAR1 peuvent interagir avec les domaines FRM-SH2 de la Janus kinase Tyk2, formant des complexes

stables capables d'interagir avec des protéines STAT2 à travers leur domaines SH2 et de les phosphoryler, initiant la cascade de signalisation jusqu'au noyau [63,66].

2.3.2 Activation et signalisation d'IFNAR

La dimérisation du récepteur est organisée en deux étapes : en premier, la fixation de l'IFN à la sous-unité IFNAR2, et ensuite, la fixation du complexe IFN-IFNAR2 à la sous-unité IFNAR1 (Figure 6) [67].

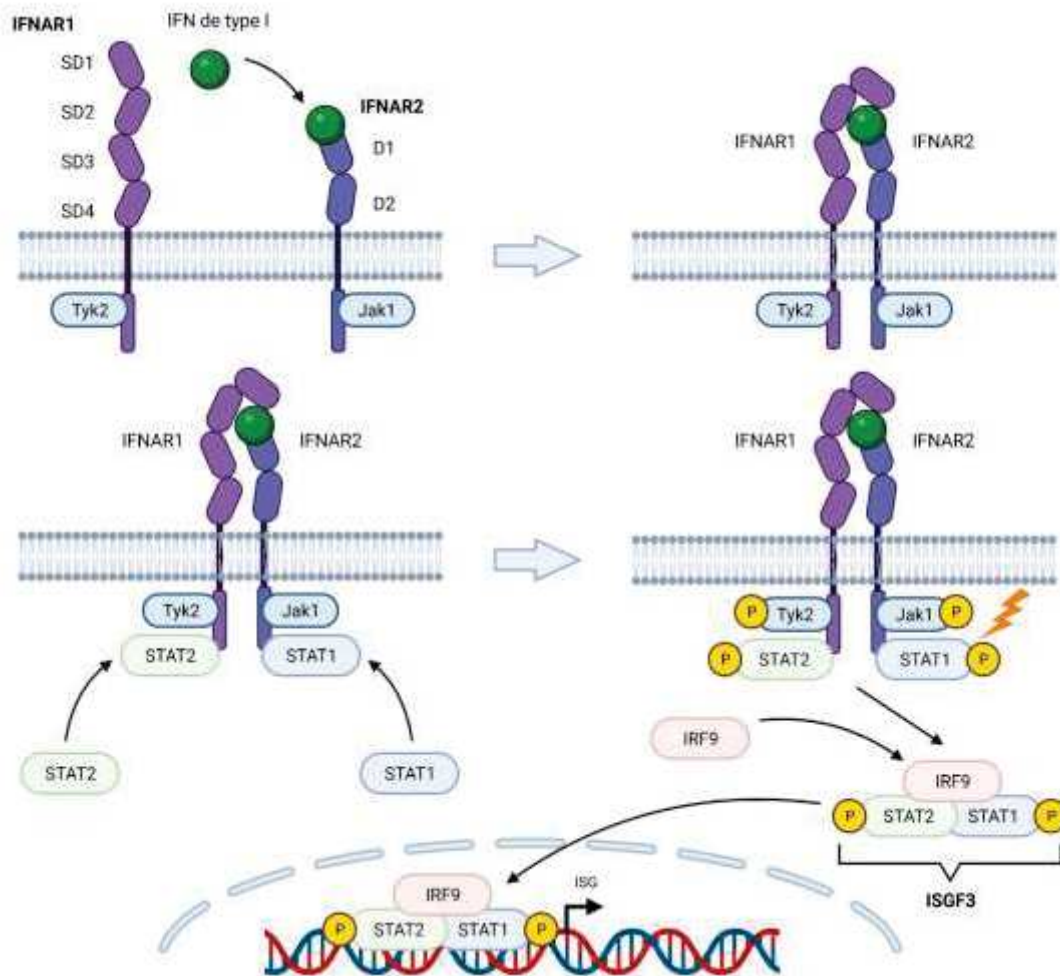


Figure 6 Activation du récepteur IFNAR et de la cascade de signalisation. Suite à la dimérisation du récepteur, la cascade de phosphorylation des protéines STAT1 et STAT2 induit la formation du complexe de transcription ISGF3.

La basse affinité d'IFNAR1 pour les IFN de type I (100 nM pour le meilleur cas, l'IFN β) provoque une liaison préférentielle pour la sous-unité IFNAR2. Suite à cela, l'ancrage de l'IFN à la membrane à travers IFNAR2, facilite l'interaction avec IFNAR1 et la formation du complexe tertiaire IFN/IFNAR2/IFNAR1, et donc la dimérisation du récepteur. Le complexe tertiaire sera stable pendant une période de co-locomotion d'environ six secondes, période suffisante pour induire la signalisation de la voie IFN [67].

La dimérisation d'IFNAR entraîne l'activation des kinases Tyk2 et Jak1 associés aux sous-unités IFNAR1 et IFNAR2 respectivement. Cette activation induit à son tour la phosphorylation des protéines régulatrices STAT1 et STAT2. Ces facteurs de transcriptions forment avec la protéine IRF9, un complexe appelé ISGF3 capable de migrer dans le noyau de la cellule et de se fixer à des régions régulatrices d'ADN appelées ISRE. Cette fixation provoque l'expression des gènes induits par les interférons (ISG). Ce panel de gènes est chargé de la pléthore d'activités des IFN de type I [68].

2.3.3 Interactions IFN de type I avec IFNAR

Les IFN de type I présentent dans leur structure des sites d'interactions avec les deux sous-unités d'IFNAR. Comme évoqué, les résidus impliqués dans ces interactions sont bien conservés parmi les différents sous-types d'IFN α et IFN β .

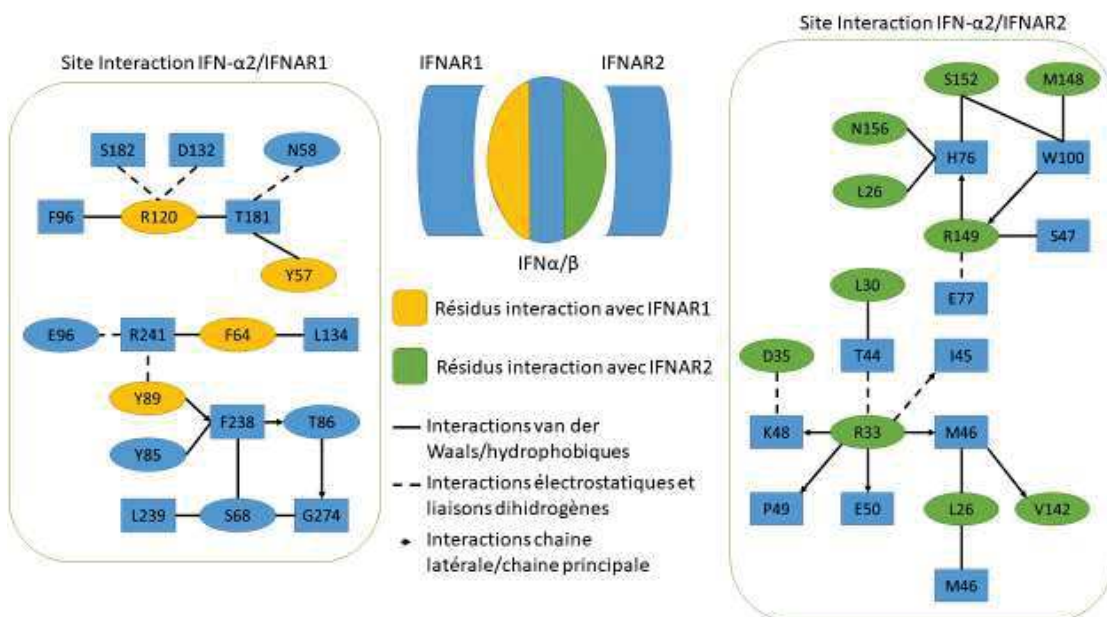


Figure 7 Carte d'interaction entre un IFN de type I (IFN- α 2) et les sous-unités IFNAR1 et IFNAR2. Les résidus des chaînes IFNAR en forme ovale correspondent à des « points chauds » dans l'affinité pour l'IFN, ayant la plus forte influence pour l'affinité cytokine/récepteur. Carte d'interactions adapté de Ng et al., 2016.

Les sous-unités IFNAR1 et IFNAR2 interagissent avec l'IFN formant un complexe en disposition orthogonale, chaque chaîne d'IFNAR se liant à des faces opposées de la cytokine (Figure 7).

L'interface IFN-IFNAR1, d'environ 1800 Å² de surface, est constituée par divers résidus des hélices A, E et de la boucle A-B de l'IFN, ainsi que par des résidus du sous-domaine D1 du domaine ectopique d'IFNAR1. Quant à l'interface IFN-IFNAR2, elle comprend les hélices B, C, D de l'IFN et les sous-domaines SD1-3 du domaine ectopique d'IFNAR2,

avec une surface d'interface de 2200 Å². A la différence d'autres interactions cytokine-récepteur de la même famille, la charnière entre les sous-domaines SD2 et SD3 recouvre l'IFN, permettant une liaison de forte affinité entre les deux [47,49,50,56,69].

Malgré le fait que tous les sous-types se fixent sur les mêmes cibles, la modalité d'interaction avec le récepteur, conditionne l'activité des IFN [51,57,70]. Ce différentiel d'activité n'est pas autant dépendant des affinités individuelles des IFN de type I pour les deux sous-unités d'IFNAR, mais plutôt par la capacité de stabiliser le complexe tertiaire IFNAR2-IFN-IFNAR1. Une faible liaison du complexe tertiaire entraîne une activation transitoire du récepteur et l'internalisation des deux sous-unités d'IFNAR, induisant l'expression d'un panel d'ISG responsables de l'effet antiviral des IFN. A l'inverse, une forte liaison du complexe tertiaire IFNAR2-IFN-IFNAR1, soit par des concentrations élevées d'IFN- α ou par l'activité d'IFN de haute affinité pour IFNAR1 comme l'IFN- β , entraîne l'activation prolongée du récepteur, l'internalisation exclusive de la sous-unité IFNAR1 et l'induction d'une activité anti-proliférative, en plus d'une activité antivirale [71]. Ceci explique la variabilité d'activité entre les différents types d'IFN de type I.

2.3.4 Régulation négative de la réponse IFN de type I

Afin d'éviter une réponse IFN exacerbée, pouvant induire de la toxicité chez l'individu, des régulateurs négatifs, induits par les IFN de type I et autres cytokines pro-inflammatoires, sont capables d'interférer avec la voie de signalisation des IFN de type I (Figure 8).

La protéine USP18 est un de ces régulateurs négatifs de la réponse IFN. Cette protéine, faisant partie des ISG, peut être induite par l'activité des IFN de type I et III, formant une boucle de feedback négatif. Son action consiste à neutraliser la signalisation des IFN de type I à travers la liaison avec IFNAR2 et bloquant l'interaction IFNAR2-Jak1 [72,73].

La protéine SOCS1 (« Suppressor of Cytokine Signaling 1 ») est un élément essentiel dans la régulation négative de certaines voies de signalisation des cytokines, la réponse IFN incluse. De manière similaire à USP18, SOCS1 agit sur les kinases Janus associées aux récepteurs des IFN. Plus précisément, SOCS1 est capable de se lier à la région SH2 de Tyk2, empêchant son interaction avec IFNAR1. Ceci se traduit par une neutralisation de

la phosphorylation des protéines STAT et par une réduction de l'expression membranaire d'IFNAR1, stabilisée par Tyk2 [74,75].

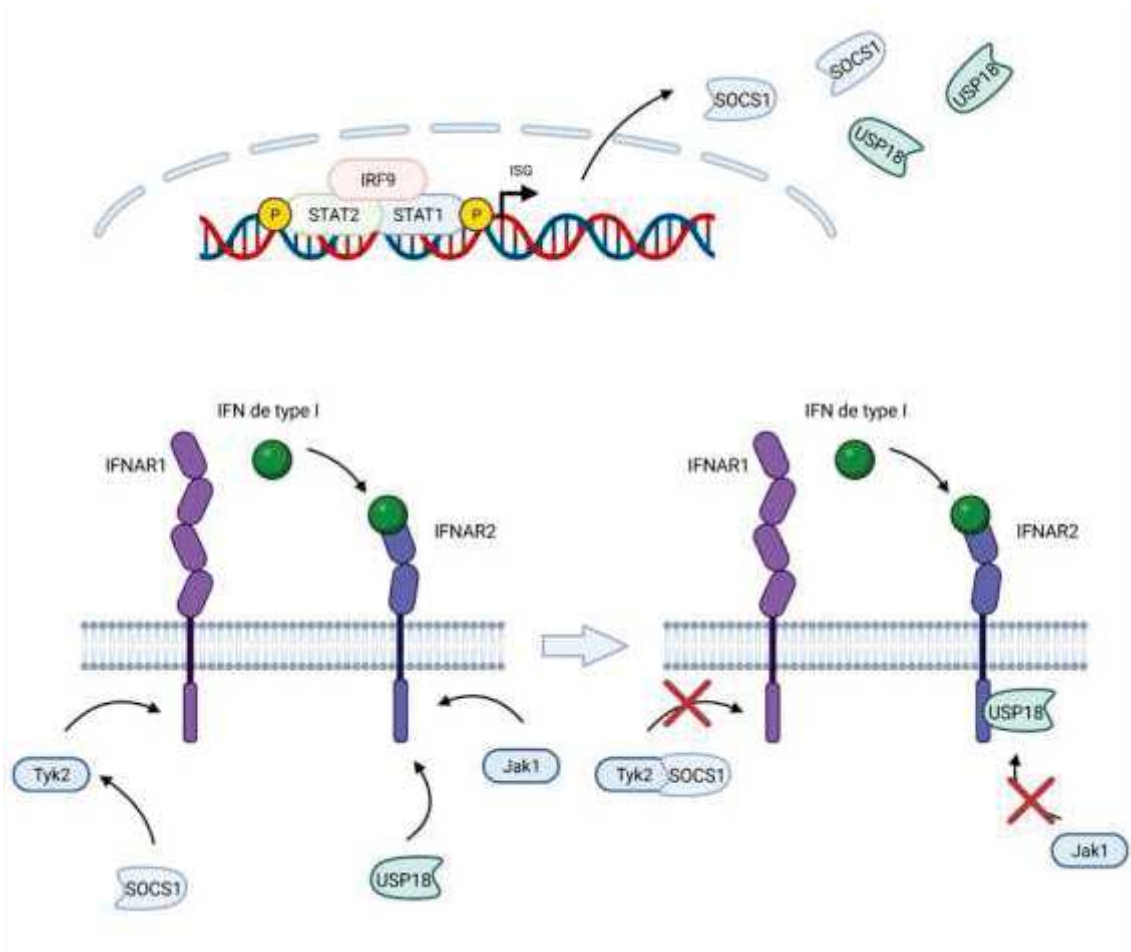


Figure 8 L'activation de la cascade de phosphorylation induite par l'activation d'IFNAR peut être neutralisée par des régulateurs négatifs de la réponse IFN comme USP18 et SOCS1. Leur action sur les kinases Janus associées aux sous-unités IFNAR1 et IFNAR2, Tyk2 et Jak1, inhibe la signalisation du récepteur et l'expression d'ISG.

2.4 IFN de type III

Les IFN de type I et type II ont été les premiers IFN décrits ; récemment, un nouveau groupe a été découvert, les IFN de type III. Cette nouvelle famille d'IFN, est constituée chez l'homme par quatre membres : IFN- λ 1 (IL-29), IFN- λ 2 (IL-28A), IFN- λ 3 (IL-28B) et IFN- λ 4. De manière similaire aux autres groupes d'IFN, ils exercent leur activité par l'interaction avec un récepteur hétérodimérique formé par les chaînes IFNLR1 et IL-10R2[76,77]. A différence du récepteur IFNAR, l'expression du récepteur IFNLR est limitée aux cellules épithéliales et à certaines sous-populations immunitaires [78,79].

Au niveau de leur structure et de leur séquence, les IFN λ présentent des différences notables en comparaison des IFN de type I, mais leur activité reste semblable. Tout d'abord, leurs voies de signalisation partagent beaucoup d'éléments, les IFN de type I et type III faisant recours aux kinases Janus et aux protéines STAT pour induire l'expression d'ISG dans le noyau (Figure 9). A cause de cela, le panel d'ISG induit par les IFN de type I et type III est similaire, ces ISG étant responsables des effets antiviraux et antitumoraux de ces cytokines [77,78,80].

	IFN Type I	IFN Type III
Récepteur	IFNAR1, IFNAR2	IFNLR1, IL-10R2
Tropisme	Ubiquitaire	Restreint
Kinases associées	Jak1 (IFNAR2), Tyk2 (IFNAR1)	Jak1 (IFNLR1), Tyk2 (IL-10R2)
Signalisation canonique noyau	ISGF3	ISGF3
Régulation	USP18, SOCS1,	SOCS1

Figure 9 Résumé de similarités des réponses des IFN de type I et des IFN de type III. Malgré une différence de tropisme entre les deux groupes de cytokines, les voies canoniques de signalisation restent très similaires, pouvant induire des activités antivirales et antitumorales chevauchantes.

2.5 Activités des IFN de type I

La réponse IFN étant une des premières lignes de défense immunitaire, elle est impliquée dans de nombreuses réponses immunitaires : réponses antivirales, antibactériennes et antitumorales. Les ISG exprimées lors de l'activation de cette voie peuvent altérer le fonctionnement de la cellule infectée ou tumorale, ainsi qu'activer les cellules immunitaires environnantes.

2.5.1 Activités antivirales de la réponse IFN de type I

Un cycle viral classique est caractérisé par la reconnaissance d'un marqueur de surface cellulaire, permettant au virus de s'y fixer et de pénétrer dans la cellule. Une fois la cellule envahie, la particule virale peut ensuite libérer son contenu et permettre la réplication de son génome et la production de protéines virales qui serviront à former des nouveaux virions prêts à perpétuer l'infection des cellules adjacentes. La dernière étape est la sortie et la libération des virions de la cellule infectée par bourgeonnement

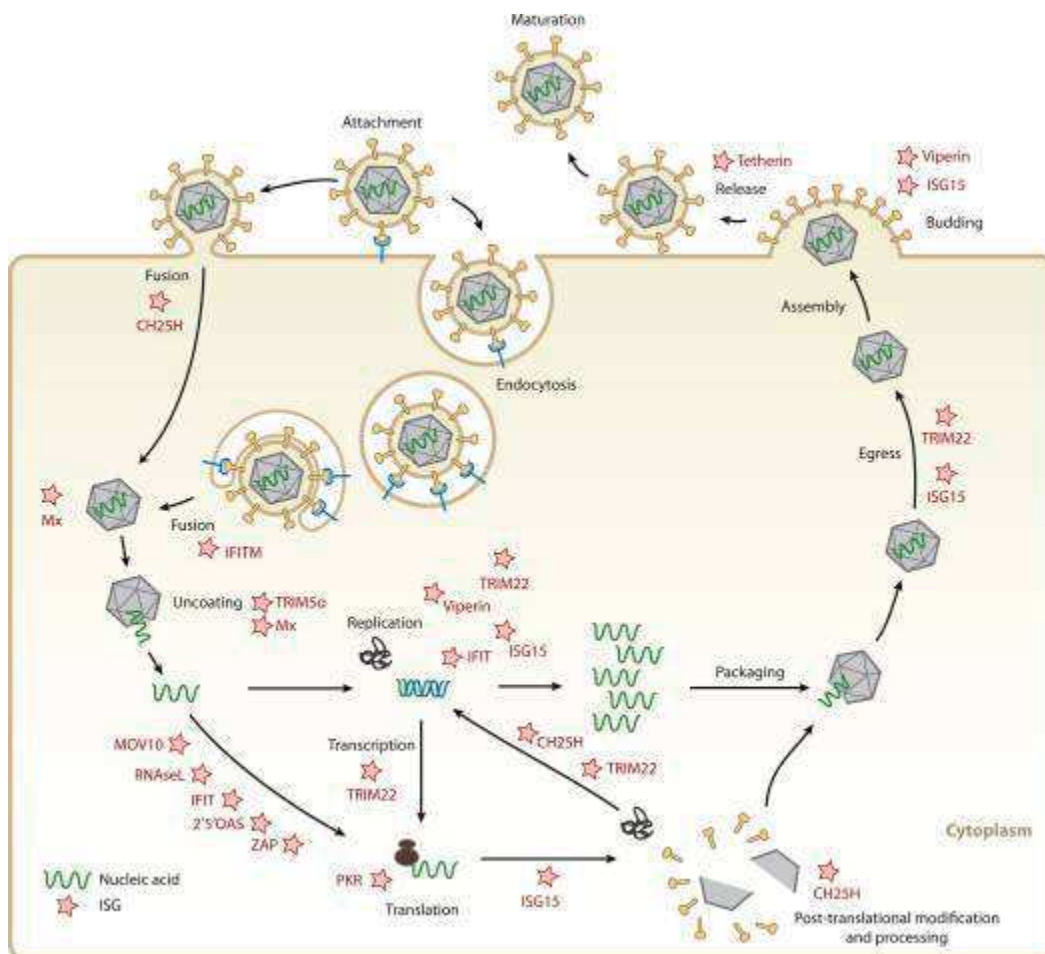


Figure 10 Les ISG impliqués dans les activités antivirales des IFN de type I. La réponse IFN se déclenche suite à la détection d'un danger, induisant la libération d'IFN, l'activation du récepteur et l'expression des ISG. Ces ISG sont capables d'intervenir à différents stades de cycle viral. Extrait de [81].

de la membrane cellulaire ou par la lyse de la cellule. Les ISG antiviraux peuvent agir aux différents stades de l'infection virale : entrée, réplication et sortie (Figure 10) [81].

2.5.1.1 Inhibition de l'entrée de particules virales

Une des familles les plus importantes dans l'inhibition de cette étape sont les protéines IFITM (Interferon-Inducible Transmembrane protein) comptant parmi leur rang les protéines IFITM1, IFITM2 et IFITM3. Bien que tous les virus ne sont pas sensibles à l'effet antiviral des IFITM, certains comme le virus influenza, le virus de la dengue ou le virus du Nil de l'Ouest sont neutralisés aux stades précoces de l'infection [82–84]. Les mécanismes d'action exacts restent encore à élucider, cependant certaines voies particulières d'entrée virale sont suspectées d'être neutralisées par la famille des IFITM. Les fusions pH-dépendantes ou cathepsine-dépendantes sont fortement neutralisées, affectant de nombreux virus tels que le virus de Marburg (MARV) ou le virus de l'influenza A (IAV) [83]. De plus, l'expression de protéines IFITM inhibe l'hémifusion membranaire, réduisant donc la transmission de particules virales entre cellules suite à la formation de syncytiums de cellules infectées par le IAV ou le retrovirus de mouton de Jaagsiekte (JSRV) [85].

D'autres ISG comme le Cholesterol-25-hydroxylase (Ch25h) peuvent neutraliser l'entrée de virus tels que le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le virus de l'herpès simple (HSV), ou le cytomégalovirus de souris (MCMV) [86,87]. Cette enzyme catalyse l'oxydation de cholestérol en 25-hydroxicholestérol. Cet oxysterol contient des propriétés antivirales grâce à la capacité de moduler la membrane cellulaire réduisant la capacité de fusion de virus à sa cible [86].

2.5.1.2 Inhibition réplication virale

Malgré l'existence de mécanismes antiviraux visant à neutraliser l'entrée de virus dans la cellule, la plupart de nos défenses antivirales moléculaires médiées par les ISG sont centrées sur la neutralisation de la réplication virale à différents stades. Le virus ayant besoin de la machinerie de synthèse protéique et de matériel génétique afin de se reproduire, des éléments de sauvegarde sont mis en place pour stopper le fonctionnement normal de la cellule infectée.

2.5.1.2.1 Inhibition de synthèse de protéine

2.5.1.2.1.1 Voie OAS/RNase L

Nos défenses antivirales non seulement peuvent arrêter la réplication virale en inhibant la synthèse protéique des cellules infectées, mais aussi dégrader les ARN viraux localisés dans le cytosol. Les oligoadenylate synthases (OAS) sont une famille de protéines inductibles par les IFN de type I composée par OAS1, OAS2, OAS3 et OASL [82,88]. Ces protéines sont capables de détecter la présence d'ARN double brin et de synthétiser des oligonucléotides 2'-5'. La RNase L est donc activée suite à la synthèse de ces nucléotides ce qui entraîne une dégradation des ARN présents dans le cytosol, inhibant la synthèse protéique [82].

2.5.1.2.1.2 Protéine PKR

La protéine kinase ARNdb-dépendante (PKR) est une protéine inductible par les IFN de type I et régule la traduction protéique dans le cadre de la réponse antivirale. Elle est constituée de domaines N-terminales de fixation à l'ARN, ainsi que d'un domaine catalytique serine/thréonine kinase [89]. Suite à la fixation d'ARN double brin, la protéine PKR induit la phosphorylation de la sous-unité α du facteur d'initiation de la traduction eucaryote 2 (eIF2 α). La sous-unité α de ce facteur est indispensable au transport AUG-dépendante d'ARNt au ribosome 40S, et donc à l'initiation de la machinerie de traduction. Cette phosphorylation inhibe l'initiation de toute synthèse protéique par la séquestration d'eIF2 α phosphorylée par la sous-unité eIF2 β , chargée de l'échange de GTP [90].

2.5.1.2.1.3 Protéines IFIT

Une autre famille d'ISG exerçant des effets antiviraux directs est la famille des « Interferon-induced proteins with tetratricopeptide domains » (IFIT). Ces ISG se trouvent principalement dans le cytoplasme et peuvent être induits par une stimulation des IFN de type I ou par l'activation de PRR IFN-indépendant [91]. Cette famille est principalement composée par les membres IFIT1 (ISG56), IFIT2 (ISG54) ainsi que IFIT3 (ISG60). Certains, comme le VSV, le papillomavirus humain (HPV) ou IAV, se montrent particulièrement sensibles à l'action de ces protéines.

IFIT1 est capable de reconnaître et de se fixer à des ARN viraux phosphorylés à leur extrémité 5' triphosphate (5'-ppp). Suite à cette fixation, les protéines IFIT2 et IFIT3 sont en mesure d'interagir avec le complexe IFIT1-ARN, empêchant la réplication et la traduction du matériel génétique viral [92]. Dans le cadre de l'infection par le HPV, il a été décrit que IFIT1 est également capable de se fixer à la protéine virale E1, une hélicase essentielle pour la réplication du virus, et de la séquestrer dans le cytosol [93].

2.5.1.2.2 Arrêt du cycle cellulaire

Les CDK (kinases dépendantes de cyclines) sont des régulateurs essentiels dans le déroulement du cycle cellulaire de toutes cellules eucaryotes [94,95]. La phosphorylation des résidus serine/thréonine de ces kinases est régulée par leurs interactions avec des protéines telles que des cyclines et des inhibiteurs de CDK (CKI) comme p21 et p19 [95].

L'activité des CDK peut être régulée par l'action des IFN de type I [96,97]. Certains virus ayant un génome ADN, nécessitent la machinerie de réplication de l'ADN de la cellule hôte pour se répliquer. L'arrêt du cycle cellulaire est donc un frein important à la prolifération du virus, et ainsi un mécanisme que nos défenses antivirales peuvent exploiter. Dûe à leur importance dans la prolifération cellulaire, la régulation des CDK est souvent perturbée par certains agents viraux et dans le cadre du développement tumoral [82,98,99].

2.5.1.2.3 Induction de l'apoptose

L'induction d'apoptose par les IFN de type I est un autre moyen de réduire la réplication virale. Suite à la surexpression de la PKR dûe à la détection de matériel génétique viral et de l'induction IFN-dépendante de la PKR, plusieurs gènes sont activés, tels que des récepteurs de mort cellulaire comme FAS, afin d'initier des mécanismes d'apoptose et de contrôle du cycle cellulaire [100]. La protéine FADD (Fas-associated death domain) est un adaptateur du complexe DISC (Death-induced signalling complex) responsable de l'induction de la voie caspase [101]. Elle est capable d'interagir avec des trimères du récepteur FAS qui, en conjonction avec la caspase 8, forment un complexe clivant Bid, une protéine de la famille Bcl-2 induisant la libération du cytochrome C, des mitochondries et le déclenchement de l'apoptose [102].

Cependant des régulateurs négatifs de l'apoptose tels que cFLIP (Cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme) inhibitory protein) ralentissent le déclenchement de l'apoptose induite par l'IFN. Cette protéine a la capacité de se lier à des régulateurs proapoptotiques tels que FADD ou le récepteur TRAIL 5, inhibant la formation du complexe DISC [103]. Cette neutralisation est basée sur l'équilibre du ratio de cFLIP et de la caspase 8 induite par les IFN de type I, jusqu'à ce que l'accumulation de caspase 8 finisse par déplacer cFLIP du complexe DISC et déclenche l'apoptose.

2.5.1.3 *Inhibition sortie virale*

Cependant les ISG ne limitent pas leur action à empêcher l'entrée des virus et limiter leur réplication. Certains ISG, comme ISG15, vipérine ou l'antigène stromal de moelle osseuse 2 (BST-2) sont spécialisées dans la neutralisation de la sortie virale de la cellule infectée.

ISG15 est une protéine « ubiquitin-like » induite par la réponse IFN de type I, capable de neutraliser le bourgeonnement (« budding ») précoce et tardif de rétrovirus, comme le VIH et le virus du sarcome aviaire (ASLV). Cette activité est liée aux protéines virales Gag des rétrovirus. Celles-ci peuvent interagir avec des protéines ESCRT, telles que ESCRTIII, impliquées dans la restructuration des membranes cellulaires nécessaires pour leur bourgeonnement [104]. L'activation d'ESCRTIII nécessite de l'activité ATPase de Vps4, activée à son tour par LIP15. Cependant, ISG15 est capable d'empêcher son activation à travers l'union et la séquestration de LIP15, ce qui finalement provoquera l'inhibition de ESCRTIII et le bourgeonnement des particules virales [105,106].

De manière similaire à ISG15, la vipérine est un ISG capable de neutraliser le bourgeonnement du virus en perturbant les radeaux lipidiques de la membrane des cellules infectées, structures membranaires essentielles pour la sortie de particules virales de nombreux virus tels que le virus de l'influenza A ou le virus (IAV) de l'hépatite C (HCV) [107,108]. Cette action est possible grâce à l'inhibition de l'enzyme farnesyl diphosphate synthase (FPPS), responsable de la synthèse d'isoprénoïdes, eux-mêmes nécessaires à la formation de cholestérol composant les radeaux lipidiques [109]. Dues au changement de composition de ces structures membranaires, les particules virales présentent de plus grandes difficultés à interagir avec la membrane de la cellule hôte.

La protéine BST-2 (aussi connue en anglais comme « theterine ») contribue elle aussi à l'échappement des particules virales de la cellule infectée. Cette protéine agissant en forme de dimère présente à chaque extrémité deux domaines d'ancrages dans la membrane cellulaire, ainsi qu'un domaine extracellulaire servant de lien entre les deux ancrés. Ces domaines d'ancrages sont capables d'interagir avec les composantes lipidiques des enveloppes virales et de retenir les bourgeons émergeant à la surface de la cellule[110]. De nombreux virus enveloppés sont affectés par cet ISG, tel que le VIH ou le Chikungunya [110,111].

2.5.1.4 Protéines Mx

Conservés à travers de nombreuses espèces, les membres murins Mx1 et Mx2 confèrent une protection envers des virus comme le virus de l'influenza A (IAV) et le VSV, respectivement [112–116]. Dans le cas d'*Homo sapiens*, MxA est la protéine prédominante de la famille des Mx. Son action englobe une pléthore de virus : VSV, IAV, HBV, virus de la rage, parmi d'autres [112].

Même si leur implication dans les systèmes de défense antivirale est depuis longtemps établie, leur exact mécanisme moléculaire d'action n'est pas encore complètement élucidé. Ces dernières années, des études démontrent leur interaction avec les nucléoprotéines (NP) des virus à travers la formation de dimères et tétramères de protéines MxA, inhibant la réplication du matériel génétique viral [117,118].

2.5.2 Modulation de la réponse immunitaire

Les IFN de type I étant des cytokines aux actions extrêmement plurivalentes, ils ne se limitent pas à moduler le fonctionnement des cellules infectées et leurs voisines afin de neutraliser la réplication des virus. Le système IFN est fortement impliqué dans l'initiation de la réponse immunitaire innée dans le cadre d'infection virale et bactérienne qui est ensuite suivie de la réponse immunitaire adaptative (Figure 11).

De plus, des observations récentes montrent que les interférons I joueraient aussi un rôle dans l'initiation de la réponse immunitaire antitumorale. En effet, la réponse interféron de type I qui est aussi accompagnée de la libération de nombreuses chimiokines attire différents types de cellules immunitaires. De plus, les interférons de type I participent à la maturation des cellules présentatrices d'antigènes telles que les

cellules dendritiques qui peuvent alors activer des réponse lymphocytaires T CD8+ cytotoxiques [119,120].

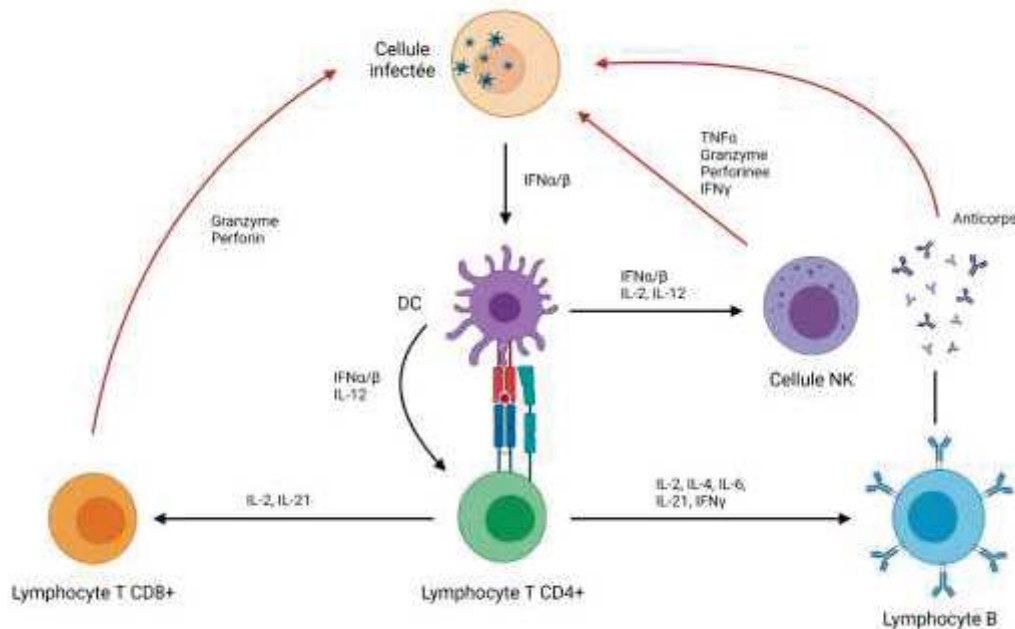


Figure 11 Modulation de la réponse immunitaire par les IFN de type I suite à une infection virale. L'activation de la réponse IFN de type I par une infection virale déclenche les réponses immunitaires innées et adaptatives impliquées dans l'élimination du virus. Adapté de Gujar et al. 2017.

2.5.2.1 Rôle des IFN de type I dans la présentation d'antigène

Afin d'engager une réponse immunitaire puissante, des mécanismes visant à amplifier la reconnaissance d'antigènes viraux ou tumoraux sont nécessaires. Les IFN de type I ont la capacité d'engager l'expression de protéines responsables de la présentation de ces antigènes. Ils provoquent, notamment, la maturation des cellules dendritiques qui peuvent alors migrer vers les organes lymphoïdes secondaires et présenter les antigènes phagocytés aux lymphocytes T.

Les protéines du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) sont des protéines membranaires chargées de la présentation de peptides issus d'antigènes aux lymphocytes T. Il s'agit d'une famille de protéines longuement étudiée pour leur rôle dans la réponse immunitaire innée et adaptative, découverte dès 1936[121]. Il existe deux types de CMH, les CMH de classe I présentes sur toutes les cellules nucléées de l'organisme et les CMH de classe II, portées surtout par les APC. Leur expression est

fortement liée à l'activation des voies IFN de type I et type II ainsi que par l'activité de NF- κ B [122]. Elles peuvent lier des peptides d'origine virale ainsi que des peptides propres à la cellule [123]. Ces complexes antigène-CMH pourront à leur tour interagir avec les récepteurs de cellules T (TCR) de nombreux lymphocytes impliqués dans les réponses adaptatives antitumorales et antivirales.

2.5.2.2 Modulation de la réponse innée par les IFN de type I

Suite à l'infection virale, les IFN de type I libérés peuvent recruter et activer les cellules dendritiques (DC) [37]. Issue de progéniteur myéloïde commun aux macrophages et DC, cette population d'APC sert à relayer le message de danger entre le site de l'infection et le reste des cellules effectrices et initier l'ICD. Parmi les DC, nous pouvons trouver des sous-populations avec des rôles bien définis, tels que les DC conventionnelles (cDC) ou les DC plasmacytoïdes (pDC).

Les cDC sont une sous-population spécialisée dans la présentation d'antigènes et la libération de chemokines et cytokines pro-inflammatoires, capables d'induire l'activation de lymphocytes T CD4 et CD8 [124–126]. En contrepartie, les pDC sont un sous-type de ces cellules sentinelles, spécialisées dans la libération des IFN de type I, grâce à des senseurs aux ARN et ADN viraux tels que TLR7 et TLR9. Cette libération est essentielle dans l'activation des voies antivirales moléculaires visant à contenir l'infection virale, ainsi que dans l'activation d'autres cellules immunitaires effectrices telles que les lymphocytes B, T CD8+ ou cellules NK [37,127].

Les cellules « Natural Killers » (NK) sont elles aussi activées par des cytokines pro-inflammatoires, dont les IFN de type I, libérées par des APC tels que les DC ou des macrophages [128]. Suite à leur activation, ces cellules effectrices libèrent des molécules cytotoxiques telles que des granzymes, capables d'induire l'apoptose caspase-dépendante des cellules infectées [129,130], ou des perforines, capables de former des canaux sur la membrane plasmique lysant la cellule [131]. Additionnellement, les NK exercent leurs fonctions à travers la libération de cytokines telles que l'IFN γ et le TNF α , amplifiant la réponse immunitaire.

2.5.2.3 Modulation de la réponse adaptative par les IFN de type I

Parmi les différents types de lymphocytes T, la population CD4+, classifiée sous l'appellation de « T helpers » (Th) exerce une fonction régulatrice essentielle pour la réponse immunitaire adaptative. Leur activation à travers les IFN de type I et la détection de particules virales par les APC [37,132], induit l'expression de CMH classe II et de molécules co-stimulatrices CD80 et CD86 sur les APC, ainsi qu'un profil variable de cytokines. Ceci va à son tour favoriser la présentation antigénique dans les organes lymphoïdes afin d'activer les lymphocytes naïfs par des interactions CMHII/TCR, CD80/CD28 et CD86/CD28 avec les APC [133]. Les lymphocytes T CD4+ peuvent se différencier en Th1, Th2 ou encore des Tfh. Les Th1 favorisent l'activité antivirale des lymphocytes T CD8+ par la sécrétion d'IL-12 IL-15, ou IL-21 ainsi que par des interactions CD40-CD40L [132,134]. Les lymphocytes Tfh peuvent interagir avec des lymphocytes B du centre germinale (GC), à travers des interactions CD40-CD40L. Ceci est essentiel dans l'activation de la réponse humorale assurée par les lymphocytes B, ainsi que dans la génération de cellules B mémoires, essentielles à l'immunité mémoire de longue durée [135,136]. Les Th2 peuvent également favoriser la réponse anticorps des lymphocytes B par des interactions CD40-CD40L, ainsi qu'à travers la sécrétion de diverses cytokines comme IL-2, IL-4, IL-21 et IFN γ [37,133,137]. Il existe également des lymphocytes T CD4+ Th17 caractérisés par la production d'IL-17 qui a une activité pro-inflammatoire, et des lymphocytes T CD4+ CD25+ FOXP3+, appelés aussi lymphocytes T CD4+ régulateurs (Treg) car exerçant une activité immunosuppressive.

Les lymphocytes T CD8+ incluent une population de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) actifs, effecteurs de la réponse immunitaire antitumorale. Leur activation est fortement liée à l'activité des IFN de type I, et d'autres cytokines pro-inflammatoires, ainsi que par la détection d'antigènes à travers leurs TCR [138]. L'activité des IFN de type I est également essentielle pour la survie des CTL et la formation de cellules T CD8+ mémoires, permettant une immunité prolongée dans les cas d'infection chronique [138–140]. Suite à leur activation, les CTL exercent leurs fonctions à travers des mécanismes similaires aux lymphocytes NK. Tout d'abord, la libération de granzymes et perforines causent un effet cytolytique direct dans les cellules infectées. De plus, les lymphocytes T CD8 sont

aussi capables de libérer des cytokines pro-apoptotiques comme l'IFN-g et le TNF α , induisant la mort de cellules infectées.

Le dernier groupe de lymphocytes effecteurs dans la réponse immunitaire adaptative sont les lymphocytes B, des cellules spécialisées dans la réponse humorale grâce à la production d'immunoglobulines [141]. Contrairement aux lymphocytes T, les lymphocytes B détectent des antigènes grâce à la présence d'un complexe formé par des IgM et des protéines transductrices de signal CD79, formant le récepteur de cellules B (BCR). Suite à cette activation, une partie de ces cellules B deviendra des plasmocytes, spécialisés dans la production en masse d'anticorps. Différents types d'anticorps seront produits à différents moments. La réponse initiale est principalement médiée par les IgM libérées sous forme de pentamères, fort inducteurs de la voie du complément ainsi que de l'opsonisation de leurs cibles [142,143]. La deuxième vague humorale est médiée par la libération d'IgG, l'isotype le plus commun, agissant sous forme monomérique. Les IgG démontrent des activités similaires aux IgM, activant la voie du complément, ainsi qu'opsonisant les cellules ciblées par leur fixation. Additionnellement, les différents isotypes des IgG ont une affinité variable pour les divers types de récepteurs Fc, activant divers cellules immunitaires de la réponse innée ou adaptative, et causant un contrôle de l'infection virale par ADCC [143,144].

2.5.3 Toxicité des IFN de type I

Comme nous l'avons évoqué, le récepteur aux IFN de type I est exprimé de manière ubiquitaire dans l'organisme. Bien que cela permette une défense systémique, elle peut engendrer de la toxicité dans de nombreux tissus. Ces effets peuvent être causés par une administration exogène en forme de traitement, mais aussi par un dérèglement pathologique de la réponse immunitaire.

Une étude sur l'efficacité de traitement par des IFN I dans les leucémies myéloïdes chroniques (LMC) a pu répertorier de nombreux effets secondaires chez les patients suivant le traitement pendant une longue durée. Ces effets secondaires pouvaient inclure des symptômes grippaux, nausées, fatigue, perte de poids, hématotoxicité ainsi que des troubles dépressifs [145]. Malgré l'efficacité du traitement, les effets secondaires, trop nombreux et lourds, limitaient l'application des IFN de type I dans ce genre de pathologie.

2.5.4 Interféronopathies

Cependant, les effets nocifs ne se limitent pas aux traitements anticancéreux, un dysfonctionnement de la voie IFN est également relié à des troubles auto-immunitaires. Une des interféronopathies classiques est le lupus systémique érythémateux (LES), une pathologie caractérisée par la génération d'auto-immunité envers des tissus sains de l'organisme, comme la peau, les articulations, les reins, les vaisseaux sanguins ou le système nerveux. Les IFN de type I sont à l'épicentre de la maladie. Une étude en 1979 avait remarqué la protection aux infections virales sur des patients atteints de LES. Des analyses sanguines de ces patients avaient révélé un taux très élevé d'IFN de type I ainsi qu'une corrélation entre le taux d'IFN et la présence d'anticorps anti-ADN, une des caractéristiques de la maladie [146]. Dans le cadre du LES, les IFN de type I seraient responsables de la différenciation de DC en cellules présentatrices d'auto-antigènes, induisant l'activation de lymphocytes T CD4+ et T CD8+ dirigés contre soi-même [147].

La déficience de régulateurs négatifs de la réponse IFN, tels qu'USP18, est également un type d'interféronopathie. De manière similaire au lupus érythémateux systémique, les patients ayant une variante d'USP18 non fonctionnelle présentent une réponse IFN exacerbée, responsable d'une multitude d'effets indésirables. Notamment, les patients peuvent expérimenter une inflammation chronique endommageant divers tissus de l'organisme comme la matière blanche du cerveau, suite à une sur-activation de la microglie [148]. D'autres patients présentent des malformations céphaliques et cardiaques dès la naissance, en forme de microcéphalies, calcification cérébrale et élargissement des ventricules [149].

2.6 L'ampleur des défauts de la réponse IFN dans le cancer

Les IFN de type I pouvant être un frein à la progression tumorale, la perte de la production d'IFN de type I ou de la signalisation IFNAR est souvent observée et pourrait être favorable à la progression de la maladie.

Il a été décrit que la permissivité de diverses lignées de mésothéliome pleural malin (MPM) à la réplication du MV est conditionnée par leur incapacité à effectuer une réponse IFN de type I robuste [150]. La majorité des lignées sensibles au MV étaient incapables de produire des IFN de type I et d'exprimer des ISG, ce qui semble indiquer la présence de défauts de la réponse IFN en amont d'IFNAR. Le plus souvent ces défauts

de production d'IFN I étaient dus à la proximité des gènes des IFN de type I avec le gène suppresseur de tumeur *CDKN2A*. Le locus *CDKN2A* est très souvent délété lors de la progression tumorale de plusieurs types de cancer. La perte des gènes des IFN de type I est un dommage collatéral de la délétion du gène *CDKN2A* qui peut s'étendre jusqu'au gène IFN I. Cependant la perte de gènes IFN de type I ne s'accompagne pas d'une perte de la signalisation IFNAR ce qui permet aux cellules tumorales de rester sensibles aux IFN de type I produits par les cellules saines [151].

Un autre type de défaut de réponse IFN de type I observé dans l'étude de la sensibilité de lignées de mésothéliome au MV était situé en aval d'IFNAR (Achard, oncotarget, 2015). En effet, ces lignées produisaient des IFN de type I en réponse au MV, mais étaient tout de même permissives à la réplication virale. Ce type de défaut de la réponse IFN de type I dans les cellules tumorales a aussi été décrite comme favorisant l'activité oncolytique du VSV (Stojdl et al., 2000). Ce type d'inactivation de la signalisation IFNAR est peu souvent dû à des mutations des gènes *IFNAR1* et *IFNAR2*, puisque lorsqu'on analyse les données du TCGA sur 10.953 patients répertoriés, tous types de cancer confondus, on ne trouve que respectivement 111 et 107 patients avec des mutations des gènes *IFNAR1* et *IFNAR2* ce qui représente environ 1%. Ces défauts de signalisation sont plus souvent dus à la perte d'éléments impliqués dans la signalisation d'IFNAR suite à son activation. Certaines lignées tumorales exhibent la perte d'expression d'éléments d'ISGF3, notamment les protéines STAT1 et STAT2, impactant l'induction d'expression d'ISG par les IFN de type I, et des activités antivirales qui en dérivent [153,154].

3 Les anticorps comme outils de ciblage

La plupart des molécules thérapeutiques chimiques exercent leur action de manière systématique, étant incapable de reconnaître des types cellulaires spécifiques. Afin de surmonter cette limitation, de nouvelles approches thérapeutiques se sont inspirées de molécules biologiques tels que les anticorps. Ces immunoglobulines sont capables de reconnaître un épitope particulier et de se fixer à sa cible. La capacité de ciblage des anticorps les rend donc des outils thérapeutiques inestimables pour : diriger une action immunitaire ciblée, moduler une voie de signalisation particulière ou vectoriser l'action d'une molécule associée à l'anticorps.

3.1 La structure des anticorps

Les anticorps, aussi connus sous le nom d'immunoglobulines, sont un groupe de glycoprotéines impliquées dans la reconnaissance d'antigènes dans la réponse immunitaire adaptative. Ces molécules peuvent être sécrétées sous forme soluble par les lymphocytes B, ainsi qu'être exprimées à la surface de ces cellules B. Nous trouvons chez l'homme cinq isotypes principaux sous lesquels les anticorps sont classifiés et présentant des structures et fonctions bien définies : IgM, IgG, IgD, IgA et IgE.

De manière générale, leur structure est caractérisée par une forme en Y constituée par deux chaînes légères et deux chaînes lourdes symétriques. On y retrouve divers fragments dans leur structure : un fragment cristallisable (Fc), capable d'interagir avec les récepteurs Fc présents sur des cellules immunitaires, et deux fragments de fixation à l'antigène (Fab). Chaque domaine est à son tour, formé par environ 110 acides-aminés, selon le type, organisés sous une conformation de feuillets β antiparallèles formant une structure bien définie, sous le nom de « immunoglobuline fold » [155,156].

Chaque région Fab est constituée par deux domaines de la chaîne lourde, CH1 et VH, et deux domaines de chaîne légère, VL et CL. Chaque domaine variable, VL ou VH, présente trois boucles correspondant aux régions variables, capables d'interagir avec l'épitope de la cible de l'anticorps. Ces structures sont connues comme régions déterminantes de complémentarité (CDR).

Quant à la région Fc de l'anticorps, elle est chargée des fonctions effectrices de l'anticorps. Selon l'isotype, cette région est formée par deux ou trois domaines CH. Le

profil de glycosylation du domaine CH2 a une importance majeure dans la fonction de l'anticorps, modulant l'affinité à différents récepteurs Fc et activant donc diverses populations immunitaires, pouvant induire l'ADCC [144,156]. La région Fc est aussi impliquée dans l'activation du complément, à travers la fixation de protéines du complément comme C3 ou C1q [157,158].

Cependant, mis à part les anticorps classiques, d'autres formats ont été conçus afin de répondre à des besoins thérapeutiques particuliers : des propriétés pharmacocinétiques améliorées, la capacité de reconnaître plusieurs cibles ou la vectorisation de molécules thérapeutiques et de diagnostic. Certains de ces formats incluent les VHH, ou anticorps à domaine simple ; les anticorps bispécifiques, capables de reconnaître deux cibles différentes à travers la fusion de deux Fab distincts ; ou les scFv, des anticorps formés par la région variable (Fv) d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère (Figure 12).

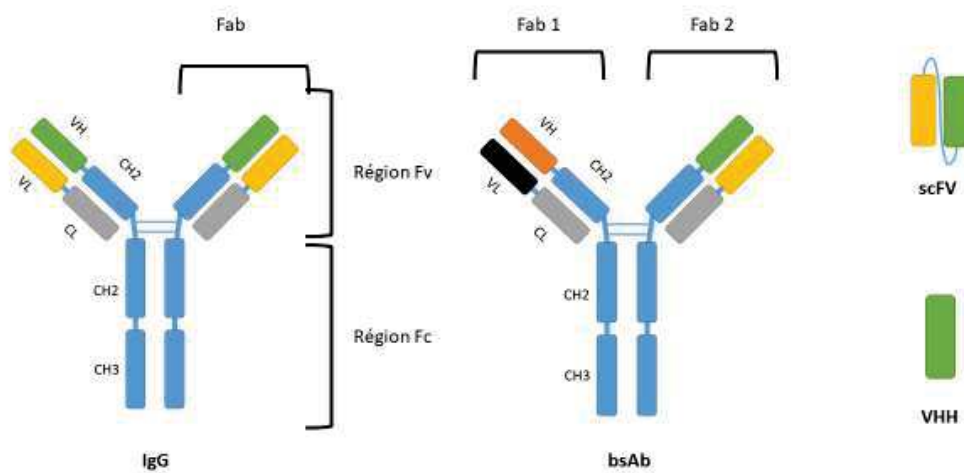


Figure 12 Formats de différents anticorps trouvés actuellement. La plupart des anticorps comme les mAbs, certains bsAb ou les hcAb présentent des fragments variables (Fv) et cristallisables (Fc), pouvant reconnaître une cible et activer la réponse immunitaire et le complément. Cependant, d'autres anticorps de petite taille ont été conçus afin de solutionner des limitations de biodistribution, des anticorps « complets ». Les VHH, les scFv sont dépourvus de leur capacité d'interagir avec les récepteurs Fc, et représentent des formidables outils de ciblage.

3.2 Les anticorps bispécifiques

La grande majorité des anticorps naturels ne peuvent reconnaître qu'un épitope particulier. Les anticorps bispécifiques sont une exception à la règle et peuvent reconnaître plusieurs antigènes à la fois.

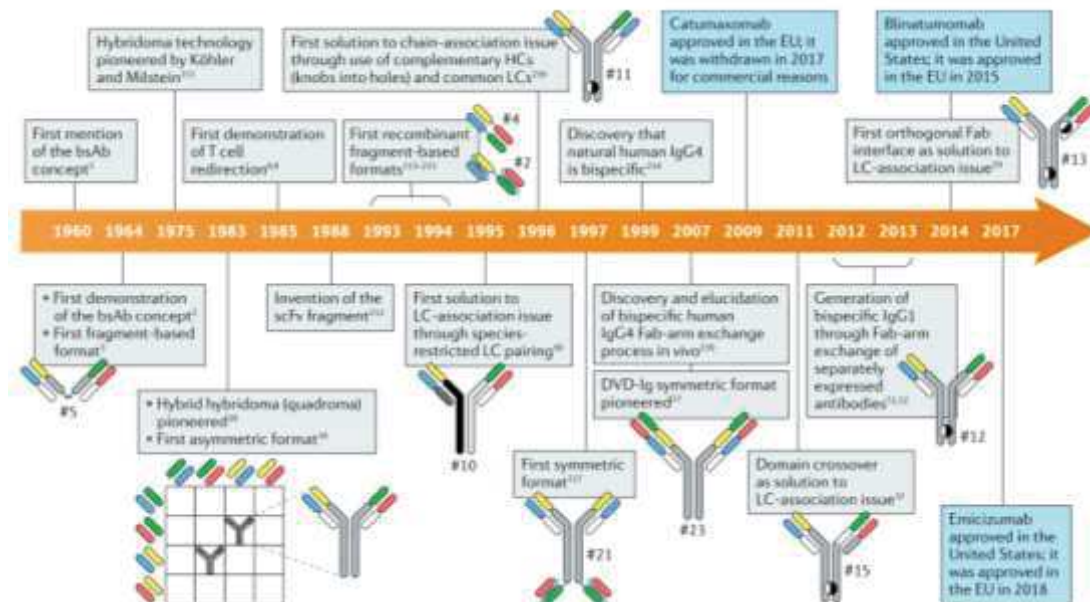


Figure 13 Historique du développement des anticorps bispécifiques. L'intérêt pour les bsAb n'est pas nouveau, depuis la conception du premier bsAb en 1964 jusqu'au Emticuzumab approuvé en 2018 par la FDA, la conception d'un anticorps capable de cibler deux antigènes différents

Le concept d'un anticorps capable de reconnaître deux épitopes différents n'est pas nouveau. En 1960, Nisonoff et al. arrivent à dissocier des fragments de chaîne légère d'anticorps de lapin et à les réassocier par réoxydation des ponts disulfures, formant des anticorps contenant deux régions variables reconnaissant deux épitopes différents [159]. Les années suivantes beaucoup d'efforts furent mis sur le développement d'anticorps bispécifiques (bsAb) à travers des techniques plus sophistiquées [160,161]. Ce ne fût qu'en 1999 que les travaux de Schuurman et ses collaborateurs ont mis en évidence l'existence d'anticorps bispécifiques naturels en forme d'IgG4 [162] (Figure 13).

Un des exemples principaux des bsAb artificiels sont les BiTE (« Bispecific T-cell Engager »), pouvant rediriger l'activité de lymphocytes T CD3+ vers une autre cellule exprimant un marqueur tumoral spécifique. Par exemple, le Blinatumomab est un

anticorps anti-CD3/anti-CD19 dirigeant des CTL contre les cellules exprimant la protéine CD19, un marqueur tumoral commun dans divers types de lymphomes [163–165].

3.3 Les nanobodies

La taille élevée des anticorps conventionnels a un impact sur leurs propriétés pharmacocinétiques, affectant la biodistribution de ces molécules dans l'organisme [166]. Une alternative de petite taille aux mAb se présente sous la forme de « single variable domain on heavy chain (VHH) antibodies », aussi connus sous le nom de nanobodies".

Contrairement aux anticorps classiques, constitués par deux chaînes lourdes et deux chaînes légères, des anticorps formés uniquement par deux chaînes lourdes ont été découverts dans des camélidés, les HcAb [167]. Ces IgG d'environ 95 kDa sont totalement fonctionnels et peuvent se fixer à leur cible avec une haute affinité, malgré l'absence de chaîne L (VL) et de domaine CH1 dans la chaîne H [168]. Les nanobodies sont des anticorps de domaine simple, conçus à partir des domaines variables des HcAb. Leur petite taille d'environ 12-15 kDa leur apporte une grande capacité de pénétration dans des tissus peu irrigués ou peu perméables, comme dans certaines tumeurs, tout en gardant tout leur potentiel de ciblage [168,169]. Cependant, cette petite taille peut également favoriser leur élimination de la circulation sanguine à travers l'excrétion rénale, ce qui limite leur utilisation à des applications de courte durée. Ceci peut être mitigé par l'utilisation de linker dit « PASylée ». Ce linker est caractérisé par une taille de 300 acides aminés en forme de répétitions hydrophiliques de proline, alanine et serine (PAS). Ceci accorde à la molécule une augmentation du volume apparent, ralentissant son élimination de l'organisme, et donc sa durée d'action [170].

3.3.1 La structure des nanobodies

Les nanobodies sont principalement composés de trois régions hypervariables (HV) en forme de boucles H, et d'un squelette conservé (Fv) constitué de 9 feuillettes β . Afin d'interagir avec leur épitope, les boucles H1, H2, H3 forment une surface de contact, constituant les trois CDR (Figure 14).

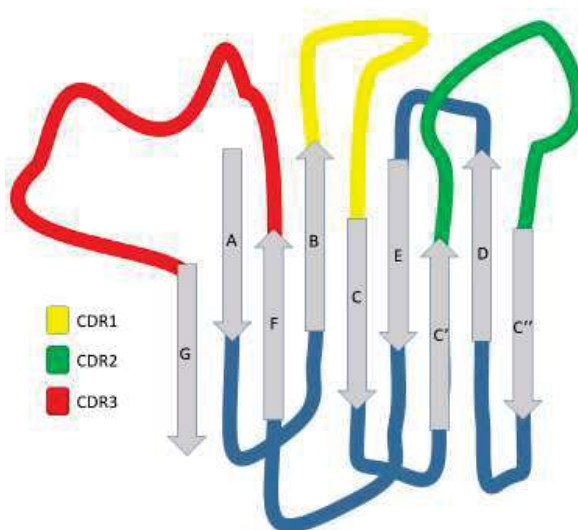


Figure 14 Structure d'un VHH classique. 9 feuillettes β constituent le corps du nanobody, et les trois boucles des CDR1, CDR2 et CDR3 constituent le site de fixation à l'antigène.

A la différence de la région Fv des anticorps conventionnels, dans les VHH les acides-aminés responsables d'interagir avec les chaînes légères (VL)

sont substitués avec des acides-aminés

hydrophiles en positions 49 et 50 permettant la solubilisation de l'anticorps en l'absence de VL [168,171,172].

Du fait que les VHH n'ont pas les 3 CDR supplémentaires provenant de la chaîne légère, les boucles H se trouvent rallongées afin d'augmenter la surface de contact avec l'épitope et ainsi maintenir une haute affinité avec leurs cibles [168,171,172].

Finalement, le fait que les VHH soient constitués uniquement de domaine V les privent de régions Fc. L'absence de région Fc capable d'interagir avec les récepteurs Fc de cellules immunitaires est responsable de la faible immunogénicité des nanobodies, ce qui restreint leur utilité à la détection et la fixation d'antigènes.

3.3.2 Application en thérapie

Après leur découverte, les nanobodies sont rapidement devenus des outils extrêmement attractifs pour le diagnostic et la thérapie antitumorale. Leur capacité de perméabilisation, leur solubilité et leur stabilité ont attiré l'attention dans le domaine des thérapies cherchant à cibler les cellules tumorales afin de neutraliser des voies de signalisation, de vectoriser des molécules thérapeutiques ou comme outil d'imagerie.

Une des cibles qui a suscité l'intérêt des nanobodies comme outil de ciblage, est le récepteur EGFR. Ce récepteur est impliqué dans de nombreux types de cancer hormono-dépendant. Plusieurs études ont employé des VHH ciblant ce récepteur dans des modèles de souris portant des carcinomes A431, démontrant une baisse de la prolifération tumorale suite au traitement [173–176]. Une autre cible extracellulaire visée par ce genre d'approche est la protéine c-Met. La neutralisation de cette protéine impliquée dans la détection du facteur de croissance des hépatocytes (HGF) permet dans des expériences *in vitro* de réduire la migration cellulaire ainsi que l'ostéogénèse, pouvant être utile dans le traitement contre le myélome multiple [177].

Les nanobodies peuvent être aussi conjugués à un grand panel de molécules à but thérapeutique, tels que des nanoparticules, des radionucléides, des lipoprotéines, des antigènes immunostimulants, des endotoxines ou même des fragments Fc capables d'induire l'ADCC. Leur petite taille permet de mieux infiltrer la tumeur et de limiter les effets non-spécifiques sur d'autres tissus [176,178,179].

Une autre application des nanobodies sous forme de vecteurs, est l'utilisation dans l'imagerie diagnostique dans le cancer. Les VHH peuvent être utilisés dans l'imagerie nucléaire, optique ou par ultrasons selon le type de molécule à laquelle ils se trouvent conjugués. Par exemple, la conjugaison de nanobody à des radionucléides comme ^{177}Lu ou $^{99\text{m}}\text{Tc}$ permet la détection des masses tumorales à travers le ciblage de marqueurs tumoraux EGFR et HER2 [180,181].

3.4 Les immunocytokines

Les activités antitumorales des cytokines en font des outils thérapeutiques prometteurs dans le traitement contre le cancer. Cependant, la toxicité attribuée à l'utilisation de ces substances oblige un dosage restreint.

Une option pour améliorer l'efficacité des cytokines serait la vectorisation de la charge thérapeutique à travers la conjugaison de la cytokine à un anticorps ciblant la lésion néoplasique. Dès les années 1990, les premières immunocytokines apparurent, liant la cytokine IL-2 à divers anticorps de ciblage contre des marqueurs cellulaires immunitaires et tumoraux [182–184]. La vectorisation de l'activité d'IL-2 présente des effets

thérapeutiques par la perméabilisation de la vascularisation tumorale, la réduction de métastases ou encore l'activation de cellules immunitaires effectrices.

Ce genre de protéines recombinantes peut avoir plusieurs formats, conjuguant la cytokine à une immunoglobuline intégrale ou à des fragments d'anticorps comme les VHH ou les scFv (Figure 15).

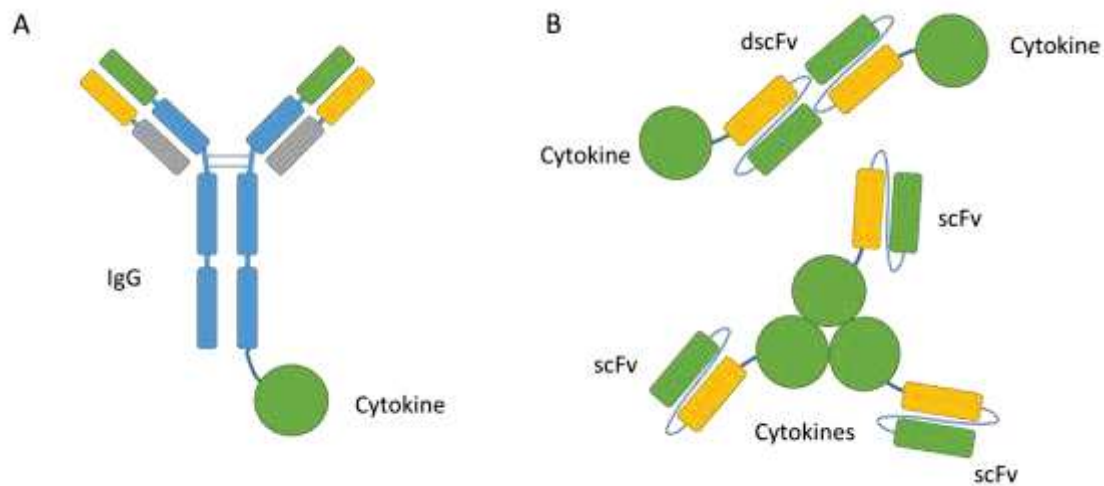


Figure 15 Les immunocytokines naissent du concept de conjuguer une cytokine pro-inflammatoire à une fraction anticorps ciblant le stroma de la tumeur. A) Les immunocytokines peuvent utiliser des immunoglobulines intégrales comme des IgG ou B) des fragments d'anticorps en forme de scFv ou dscFv.

Les « AcTaférons » sont un nouveau type d'immunocytokines, capables d'activer la signalisation d'IFNAR spécifiquement sur des populations cellulaires particulières. Ces nouvelles molécules sont composées d'un nanobody ciblant un marqueur de surface particulier et d'un IFN de type I mutant, de basse affinité pour IFNAR [185]. Leur rôle dans la manipulation de la voie IFN de type I est décrit plus en détail en aval.

3.5 Criblage d'anticorps par la technique de phage display

L'utilité des anticorps comme outils de ciblage précis et efficaces ont suscité un grand intérêt pour ces molécules dans le domaine de la recherche et de la santé. Afin de subvenir à cet intérêt croissant, des techniques de criblage de pointe ont dû être mises en place afin de faciliter et d'accélérer l'obtention de nouvelles molécules de ciblage contre un antigène d'intérêt. Une de ces technologies est la technique de phage display, mise en place par Smith en 1985 [186] et utilisée pour le criblage d'anticorps pour la première fois en 1990 [187]. Cette technique est caractérisée par des virus bactériophages entiers ou « partiels » (phagémides), exprimant à leur surface des

molécules de ciblage, comme par exemple des nanobodies (VHH). Ces constructions sont à leurs tour capables de détecter et se fixer à un antigène cible, permettant l'enrichissement des bactériophages codant pour des anticorps d'intérêt.

Un des bactériophages les plus récurrents est le bactériophage M13 (Figure 16). Ce virus est caractérisé par une forme filamenteuse et un génome d'ADN simple brin. Son matériel génétique code pour 11 protéines, dont la protéine GP3 [188]. C'est à l'extrémité N-terminal de la protéine GP3 que, par édition génétique, sont fusionnées les séquences des anticorps à cribler [186–188].

Dans le cadre de ce projet, cette technique de criblage fût utilisée pour l'obtention de nanobodies ciblant l'IFNAR1 murin.

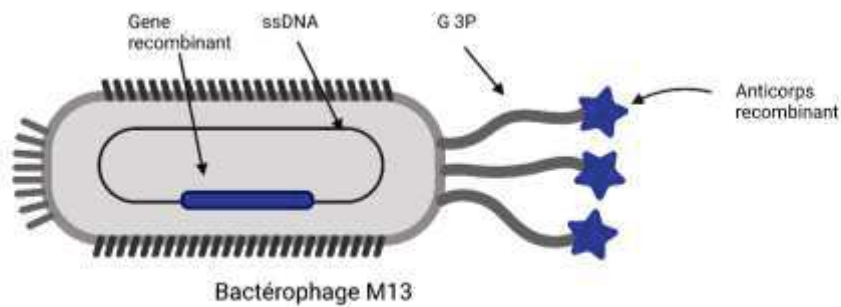


Figure 16 Structure du bactériophage M13, utilisé dans les techniques de criblage par phage display. Les molécules recombinantes sont fusionnées aux protéines G 3P et exprimées à la surface du phage, permettant la détection de leur antigène cible et le criblage des anticorps d'intérêt.

4 L'immunothérapie oncolytique

4.1 Historique de l'oncolyse virale comme traitement du cancer

Bien que les traitements radiothérapeutiques et chimiothérapeutiques conventionnels puissent conduire à une régression de la tumeur primaire, les effets secondaires nocifs et le manque d'efficacité envers l'apparition de nouvelles tumeurs secondaires associée à ces traitements demandent de nouvelles approches thérapeutiques.

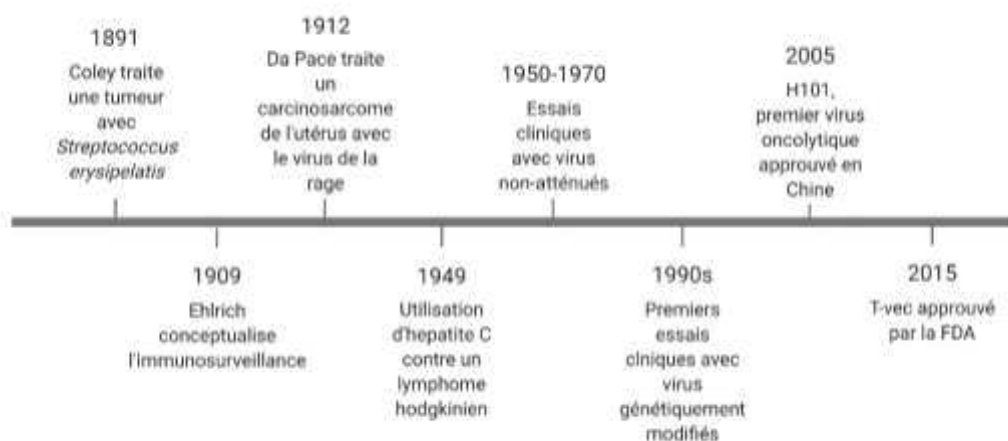


Figure 17 Résumé de l'historique de l'apparition des thérapies antitumorales utilisant des pathogènes. Commencé par l'utilisation de souches bactériennes, la notion d'immunosurveillance et plusieurs tentatives avec divers agents viraux.

L'utilisation du système immunitaire semble être une option élégante, utilisant des mécanismes de défense de l'organisme pour les rediriger contre la tumeur. Plusieurs approches ont été établies : l'utilisation de mAb ciblant des antigènes tumoraux (ex. rituximab), l'utilisation d'anticorps bispécifiques facilitant la synapse immunitaire avec la tumeur (ex. catuxomab), la thérapie cellulaire (CAR T-cells, TILs, TCR), les cytokines (ex. IL-2, IFN de type I), ou encore, les inhibiteurs du point de contrôle immunitaire (ex. anti-CTLA4, anti-PD-1 et anti-PD-L1) [189]. Cependant, une autre stratégie d'activation de la réponse immunitaire antitumorale, l'immunothérapie oncolytique, consiste en l'oncolyse virale. Cette approche se caractérise par l'utilisation d'agents viraux capables d'infecter et de se répliquer dans la cellule tumorale et de la détruire par une action lytique et immunogène [190].

La découverte des microorganismes et du système immunitaire déclencha l'intérêt de la communauté scientifique pour les interactions entre les pathogènes et notre immunité. Le concept d'exploiter des pathogènes pour traiter d'autres maladies n'est pas récent. Depuis plus d'un siècle des chercheurs ont essayé d'utiliser des pathogènes pour traiter le cancer [191]. Un des premiers rapports de ces pratiques remonte à la fin du XIX^{ème} siècle, par le Dr. William Coley au Memorial Hospital de New York. Afin de traiter un patient souffrant d'un sarcome du cou à un stade très avancé, le Dr. Coley inocula le patient avec une souche de *Streptococcus erysipelatis* directement dans la tumeur, provoquant sa rémission après de longs épisodes de fièvre [192]. Quelques décennies plus tard le docteur Nicola De Pace publia un rapport sur le traitement d'une patiente atteinte d'un cancer du col de l'utérus par l'injection d'un virus de la rage atténuée, étant un des premiers cas de virothérapie antitumorale. Suite à ce traitement la patiente expérimenta une décroissance de la tumeur, même si elle fût atteinte d'une récurrence et décéda ultérieurement de sa maladie [193].

Cependant, due à l'arrivée de nouvelles thérapies antitumorales comme la radiothérapie, la virothérapie fût laissée de côté. Il faut attendre les années 1950 pour que de nouveaux essais cliniques soient mis en place pour tester l'efficacité de divers virus. Malgré l'obtention de résultats modérés mais encourageants, les effets et pathologies secondaires attribués aux virus limitèrent l'utilisation de ces thérapies [190,191].

4.2 Exploitation des propriétés spécifiques aux cellules tumorales par les virus oncolytiques

Pendant la transformation maligne, de nombreuses altérations de la physiologie cellulaire et du microenvironnement tumoral sont accumulées. Ceci englobe des modifications dans le cycle cellulaire, des altérations métaboliques, des défauts de l'apoptose ainsi que la reprogrammation de la réponse immunitaire [194]. Ces altérations offrent un environnement favorable à la réplication des virus oncolytiques [195] (Figure 18).

Une des caractéristiques des cellules tumorales est la prolifération exacerbée due à des signaux constants de prolifération et la restriction de gènes suppresseurs de tumeurs.

Ceci favorise la réplication de certains virus oncolytiques comme les virus à ADN. Certaines modifications des virus peuvent être mises en place afin de restreindre le tropisme du virus oncolytique aux cellules cancéreuses en division, limitant l'infection dans des tissus sains. La protéine thymidine kinase (TK) exprimée lors de la réplication cellulaire se trouve souvent surexprimée dans les cellules tumorales en réplication [196,197]. Certains virus à ADN codent naturellement pour cette TK, permettant la synthèse de nucléotides des cellules infectées à leur insu. En éliminant le gène codant pour TK dans les virus oncolytiques, nous pouvons favoriser la réplication virale exclusivement dans les cellules avec une activité TK, notamment les cellules tumorales [198]. La rétention du facteur de transcription E2F par le biais de pRb est un autre mécanisme souvent altéré dans de nombreuses tumeurs. La protéine virale E1A des adénovirus peut séquestrer pRb et empêcher son action, déclenchant la réplication cellulaire [199,200]. Certains adénovirus oncolytiques ont été modifiés par édition génétique, et présentent une délétion de 24 paires de bases ($\Delta E24$) dans le gène *E1A*, neutralisant l'activité de E1A et limitant leur réplication à des cellules qui ont perdu la fonction de pRb comme certaines cellules cancéreuses [201].

La détection de dommages à l'ADN ainsi qu'une infection virale induisent l'activation de la protéine p53 provoquant l'arrêt de la machinerie cellulaire. Si ces dommages ne peuvent pas être réparés, l'apoptose sera déclenchée afin de neutraliser la cellule aberrante. Dans le cadre d'infection virale, cette apoptose limite la réplication du virus. Suite à la pression sélective engendrée par p53, l'activité de celle-ci se trouve souvent altérée dans les cellules cancéreuses [202]. Le défaut du déclenchement de l'apoptose médiée par p53 peut rendre les cellules plus permissives à la réplication virale. Cette permissivité à la réplication virale peut être exploitée à travers la délétion de protéines virales inhibitrices de p53, comme la protéine E1B55K dans les adénovirus oncolytiques [203]. Sans la protéine E1B55K, le virus se réplique préférentiellement dans les cellules tumorales avec une voie p53 inactivée, tandis que sa réplication dans les cellules saines sera limitée par l'apoptose.

Comme il a été évoqué, la réponse IFN de type I, peut également être altérée lors de la transformation tumorale. Ceci peut priver les cellules tumorales des nombreuses activités antivirales causées par l'expression d'ISG, tels que PKR, capable de détecter

l'infection virale et de stopper la machinerie de traduction de protéines [204,205]. De nombreux virus neurotropes, comme le HSV, codent pour la protéine ICP35.5, capable de neutraliser la PKR et faciliter leur réplication. La délétion d'ICP35.5 est donc une stratégie utilisée dans de nombreux virus oncolytiques dérivés du virus de l'herpès [206,207].

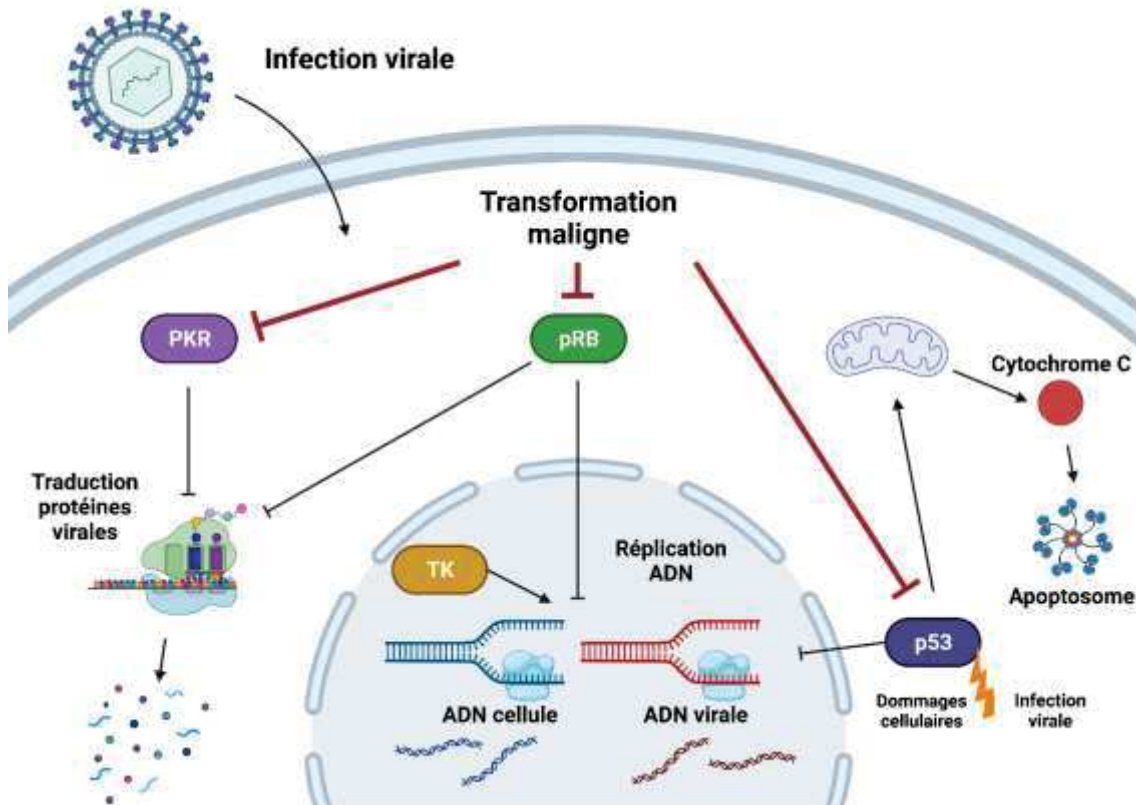


Figure 18 Exploitation des altérations des cellules cancéreuses par les virus. La transformation maligne provoque le dysfonctionnement de nombreux mécanismes cellulaires défavorables à l'infection virale. Ceci permet de créer un environnement idéal pour la réplication d'un virus oncolytique, à la différence de la plupart des autres tissus sains.

4.3 L'oncolyse virale

L'avantage d'utiliser des virus comme outils thérapeutiques est le grand panel de virus mécanistiquement distincts qui peut être employé selon le type d'activité oncolytique désirée et le tropisme cellulaire nécessaire. Certains de ces virus incluent : le VSV, le MV, divers adénovirus ou encore le HSV [195] (Figure 19).

Le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) est un virus enveloppé à ARN simple brin (sb) négatif de la famille des rhabdovirus. Le matériel génétique du virus code pour 5 protéines virales : la nucléoprotéine N, chaperonne de l'ARN viral; la protéine G, responsable de l'attachement à la membrane cellulaire ; la protéine de matrice M responsable de la courbure de la membrane virale ; la protéine L, une polymérase impliquée dans la réplication de l'ARN virale et la phosphoprotéine P, qui relie la protéine L au génome virale. Le VSV a la capacité d'infecter une grande variété de cellules, arrêtant la machinerie cellulaire et induisant un intense effet cytopathique de 12 à 18 heures après l'infection [208,209]. Cependant, l'activité du VSV est profondément affectée par l'expression d'ISG comme la PKR [210]. A cause de cela, le VSV est un outil extrêmement sensible à l'action des IFN de type I, devenant un outil utile dans l'infection spécifique de cellules résistantes aux IFN de type I [152].

Un autre virus avec un potentiel oncolytique est la souche atténuée vaccinale Schwarz du virus de la rougeole, « measles virus » (MV), un virus enveloppé à ARNs négatif de la famille *Paramyxoviridae*. Ce virus atténué est utilisé dans le vaccin rougeole oreillon

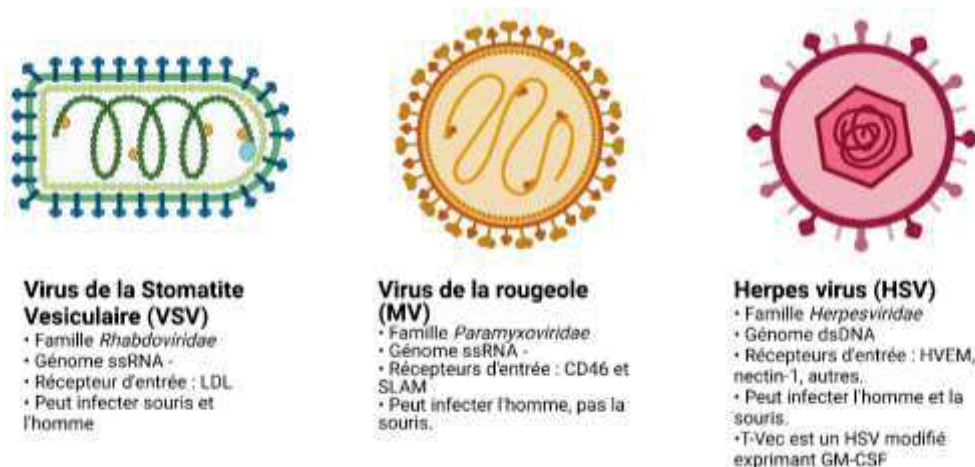


Figure 19 Exemples de certains virus oncolytiques. Leurs caractéristiques peuvent varier selon le type de génome qu'ils contiennent, leur mécanisme d'entrée et donc le tropisme de ces virus.

rubéole (vaccin ROR) pour vacciner les enfants et présente une activité oncolytique spontanée contre plusieurs types de cancer humain. Son génome code pour 8 protéines : la nucléoprotéine N, la protéine de fusion F, la phosphoprotéine P, la « Large protéine » L, la protéine de matrice M, l'hémagglutinine (H), ainsi que des transcriptions alternatives du gène P qui donnent les protéines C et V jouant un rôle de facteur de virulence. L'interaction de l'hémagglutinine avec des récepteurs de surface surexprimés dans certains cancers, comme le CD46, lui apporte une certaine spécificité tumorale, utile dans le cadre de l'oncolyse virale. Cependant, de manière similaire au VSV, le MV est un virus sensible à l'action d'ISG suite à l'activation de la réponse antivirale médiée par les IFN de type I et son activité oncolytique dépend de défauts de réponse IFN de type I dans les cellules tumorales [150,151,211,212].

L'arrivée des technologies de modification génétique des virus a ouvert la porte à de nombreuses opportunités pour solutionner les limitations rencontrées lors de la première vague d'essais cliniques, notamment en augmentant le tropisme pour la tumeur tout en atténuant l'agressivité des virus. Ces essais incluent une grande variété de virus, en monothérapie ou en combinaison de radiothérapie et/ou chimiothérapie : adénovirus, HSV, vaccinia virus, réovirus, NDV [213].

En 2005 la Chine approuva le premier traitement oncolytique, le H101. Cet adénovirus modifié peut uniquement se répliquer dans les cellules déficientes en activité de p53, une caractéristique récurrente dans les cellules tumorales. Cependant très peu d'informations sur l'utilisation de ce virus en Chine sont disponibles dans la littérature. Dix ans plus tard, en 2015, le talimogène laherparepvec (T-Vec)», un nouveau virus oncolytique fût approuvé par la FDA dans le traitement du mélanome métastatique. Ce virus de l'herpès modifié est caractérisé par la présence du gène codant pour le GM-CSF, causant la sécrétion de cette cytokine immuno-stimulatrice par les cellules infectées [190,214] (Figure 20).

Famille	Virus	Cancer/Phase	Modifications	Année approbation
Adenoviridae	H101	NSCLC (III), cancer nasopharynx (III)	(-) E1B, (-) E3	2005 SFDA (Chine)
Adenoviridae	ONYX-015	Cancer pancréas (II)	(-) E1B	-
Herpesviridae	HF10	Melanome (II)	(-) UL56, (-) LAT	-
Herpesviridae	G47Δ	Gliome (II)	(-) ICP34.5, (-) ICP6, (-) ICP47	-
Herpesviridae	T-Vec	Melanome (III)	(+) GM-CSF, (-) ICP34.5, (-) ICP47	2015 FDA EMA
Picornaviridae	PVSRIP0	Gliome (I)	Echange IRES pour l'IRES de HRV2	-
Poxviridae	Pexa-Vec	Melanome (II), HCC (III)	(+) GM-CSF, (-) TK, (+) βgal	-
Poxviridae	VV _{DD}	Cancer du sein (I)	(-) Facteur de croissance de vaccinia, (-) thymidine kinase	-

Figure 20 Résumé des principaux OV_s testés en essais cliniques pour le traitement de différents types de cancer. Malgré la grande quantité de virus testés en clinique, seulement deux virus, le T-Vec et le H101 ont été approuvés par des autorités sanitaires dans le monde.

4.3.1 Les virus oncolytiques comme outils de vectorisation

La virothérapie oncolytique est un outil très intéressant pour la vectorisation de molécules thérapeutiques. Grâce aux avancées en biologie moléculaire, le génome du virus peut être édité en insérant des gènes codants pour des cytokines, anticorps ou autres molécules thérapeutiques.

La vectorisation de cytokines permet l'activation de la réponse immunitaire au sein de la tumeur infectée par les virus oncolytiques. La cytokine la plus étudiée dans ce contexte est le GM-CSF. En effet, la première génération de virus oncolytiques qui est arrivé en essai clinique de phase III code pour le GM-CSF tels que le T-Vec ou le pexa-Vec. Le GM-CSF favorise la présentation d'antigènes notamment en stimulant la différenciation et la maturation des cellules dendritiques. Le T-Vec par exemple est un herpesvirus oncolytique qui code pour le GM-CSF et qui a été approuvé pour le traitement du mélanome métastatique [214,215]. Un autre exemple de cytokines est l'introduction du gène *ifnb* dans le génome du VSV. L'IFN-β protège les tissus sains contre la toxicité due au virus dans des modèles où la tumeur était résistante à l'action des IFN de type I [216,217]. Les virus oncolytiques peuvent également vectoriser des anticorps thérapeutiques pouvant améliorer la réponse immunitaire antitumorale. Par

exemple en neutralisant des signaux « don't eat me » des cellules tumorales à travers des anticorps anti-CD47, où par l'inhibition des points de contrôle immunitaire avec des anticorps anti-PD1 et anti-PDL1 [218,219]. Ces transgènes ne sont que quelques exemples illustrant la capacité de vectorisation des virus oncolytiques. Ils en existent de nombreux autres à l'étude [220].

4.4 Mécanisme de l'immunothérapie oncolytique :

Les virus sont des agents infectieux capables d'infecter et de détourner la machinerie de réplication des acides nucléiques et de synthèse protéique des cellules permettant sa réplication et la perpétuation des cycles infectieux. Malgré le fait que la présence de virus dans l'organisme est souvent associée à des pathologies, dans le cadre de l'oncolyse virale, ils deviennent des agents destructeurs de tumeurs très prometteurs. Leurs actions peuvent être divisées en deux grandes phases, d'abord la lyse cellulaire, puis l'activation de la réponse immunitaire anti-tumorale par la mort cellulaire immunogène (Figure 21).

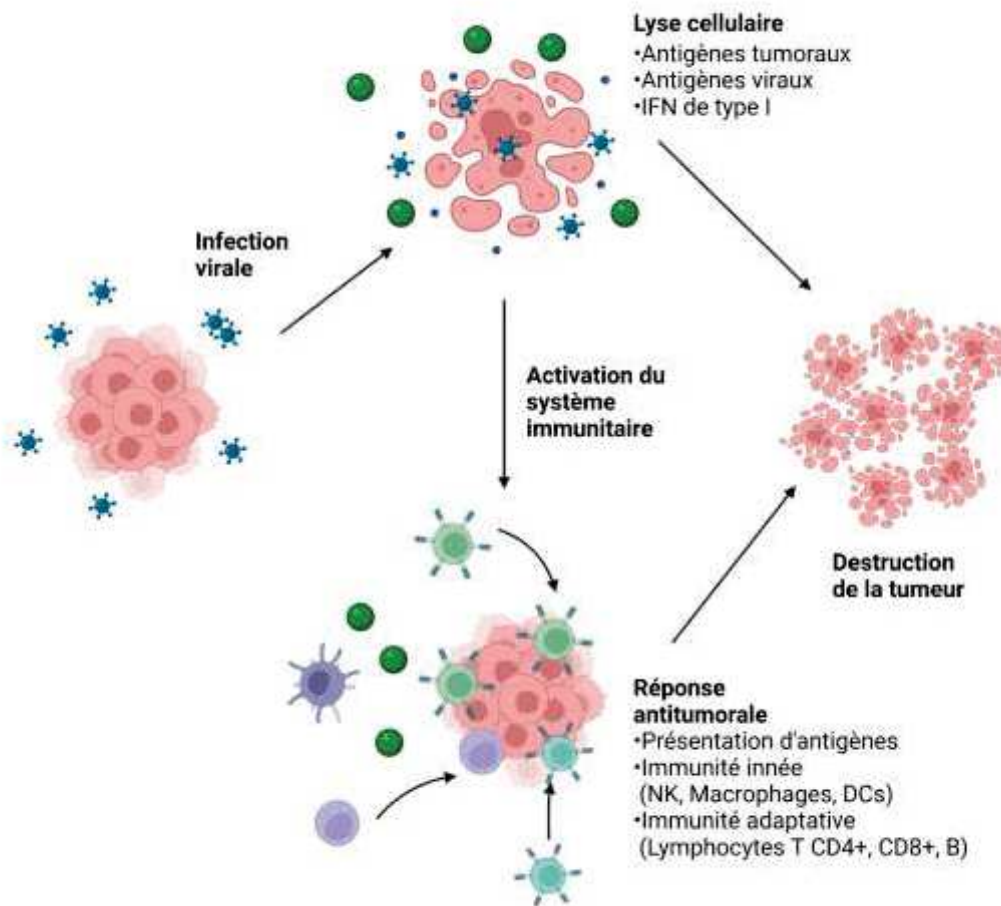


Figure 21 Mécanisme d'actions généraux impliqués dans l'activité antitumorale des virus oncolytiques. L'activité lytique du virus peut causer la mort des cellules tumorales. Cependant, l'induction de la mort cellulaire immunogène (ICD) reste indispensable pour la destruction de la tumeur.

L'effet lytique est causé par les fonctions les plus essentielles du virus : infecter et se répliquer. Suite à l'entrée du virus dans la cellule, la réplication et la production massive de nouvelles particules virales entraînent la mort cellulaire par l'altération des fonctions cellulaires et la lyse de la cellule. Cette lyse cause la libération de virions capables d'infecter les cellules tumorales adjacentes et perpétuer l'infection. Elle libère aussi de nombreux DAMP, des antigènes de tumeur et des cytokines pro-inflammatoires, notamment des IFN de type I.

Le deuxième élément de l'activité de l'oncolyse virale est la capacité d'impliquer la réponse immunitaire dans l'élimination des cellules tumorales. Comme il a été évoqué, la capacité d'immunoédition de la tumeur est une problématique majeure dans le combat contre le cancer. La libération des cytokines et des DAMP suite à la lyse des cellules tumorales attire des acteurs de la réponse immunitaire innée, activant notamment des APC. La libération d'IFN de type I par de nombreuses cellules, notamment les pDC, et la présentation d'antigènes tumoraux et viraux par des APCs comme les DC et macrophages, induisent l'activation de la réponse adaptative [211,221,222]. La combinaison de la réponse cytotoxique des lymphocytes T CD8+ et de la réponse humorale des lymphocytes B, associée à l'activité de nombreuses autres cellules immunitaires (T CD4+, macrophages, cellules NK) est donc capable de détruire les cellules tumorales infectées [37,223].

Cette activité d'immunomodulation par l'oncolyse virale peut être augmentée par la modification génétique des virus, introduisant des éléments favorisant l'induction de la réponse immunitaire. Dans la première génération d'OV testés en clinique, le gène codant le GM-CSF a été ajouté au génome viral comme dans le cas du T-Vec ou du virus pexastimogene devacirepvec (Pexa-Vec) afin de mieux activer les APC et donc la réponse immunitaire anti-tumorale. D'autres transgènes avec une activité immuno-stimulatrice sont ajoutés dans le génome des OV et sont actuellement à l'étude, comme par exemple les gènes qui codent pour l'IL-12 ou l'IL-15 [224].

Les avancées réalisées lors des dernières décennies ont permis d'obtenir des virus oncolytiques plus sûrs et efficaces. Cependant, malgré les résultats encourageants, certaines limitations comme une réponse immunitaire antivirale compétente peuvent limiter l'efficacité de ces thérapies.

4.5 Les IFN de type I, une lame à double tranchant dans l'oncolyse virale

Comme établi précédemment, les IFN de type I sont essentiels dans la réponse antivirale par l'induction de mécanismes moléculaires et cellulaires. Cependant, ce qui est fondamental pour la survie de l'individu, peut être un inconvénient dans le cadre de la virothérapie antitumorale (Figure 22).

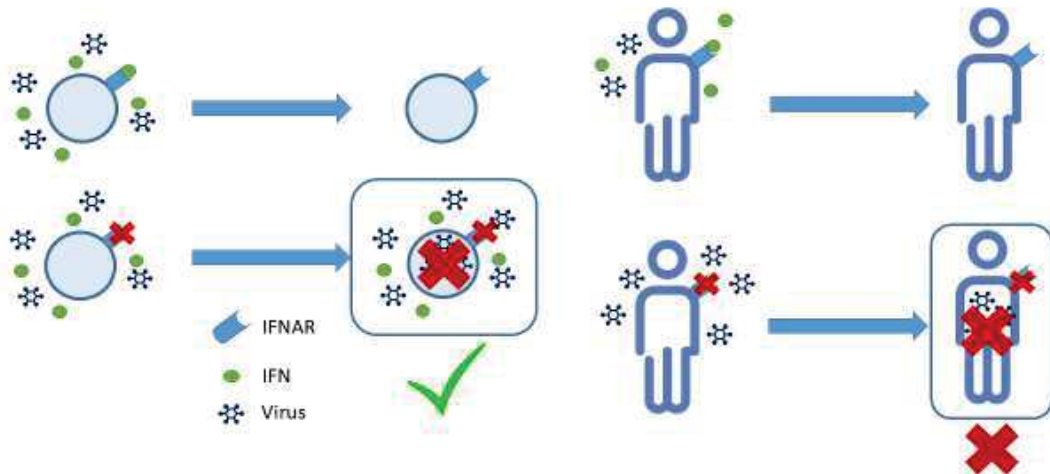


Figure 22 La réponse IFN de type I exerce un rôle ambivalent dans le cadre de l'oncolyse virale. Si la neutralisation de la voie IFN dans les cellules tumorales permet la mort cellulaire induite par le virus, une neutralisation générale serait nocive pour l'individu, induisant une toxicité exacerbée et potentiellement la mort de l'organisme.

Le dysfonctionnement du récepteur IFNAR, soit par un dérèglement constitutif ou par l'utilisation de molécules thérapeutiques, permet la sensibilisation des cellules tumorales à des virus sensibles aux IFN de type I. Des expériences *in vitro* ont déjà démontré que l'utilisation de Ruxolitinib, un inhibiteur de JAK1/2 impliqué dans la signalisation IFNAR, sensibilise différents types de cellules tumorales à l'action oncolytique de divers virus sensibles à l'action antivirale des IFN de type I [211,225–227]. L'inoculation de tumeurs MCA205 IFNAR^{-/-} dans des souris C57BL/6, immunocompétentes, démontre également la sensibilité de ces tumeurs, IFNAR-déficientes, à l'action d'une souche de Vaccinia Virus (VV) oncolytique [228]. L'administration intratumorale du virus non seulement causa la disparition de la tumeur au site d'injection, mais également dans des tumeurs éloignées non injectées (effet abscopal). Ceci démontre également l'immunisation suite au traitement oncolytique et l'implication de la réponse immunitaire [228]. Cette implication est confirmée par la neutralisation générale du récepteur IFNAR à l'aide d'anticorps neutralisants anti-IFNAR, réduisant l'efficacité du traitement oncolytique et soulignant l'importance d'une

réponse IFN de type I compétente dans le reste de l'organisme pour induire la réponse immunitaire anti-tumorale.

En effet, une neutralisation générale d'IFNAR avec le ruxolitinib ou des anticorps dirigés contre IFNAR entraînerait des conséquences néfastes pour les patients soumis à de la virothérapie antitumorale. En effet, les IFN de type I ont un rôle dans l'induction de la réponse immunitaire anti-tumorale et l'inhibition de la signalisation IFNAR sur les cellules immunitaires serait délétère pour cette réponse. De plus, les IFN de type I protègent les cellules saines de la réplication virale et l'inhibition de la signalisation IFNAR sur les cellules saines les rendraient sensibles au virus. Un exemple illustrant cette problématique est la haute toxicité induite par les infections virales dans des souris IFNAR^{-/-} [229–232]. Ce phénomène fût aussi observé dans des individus avec un dysfonctionnement dans la signalisation d'IFNAR après avoir été vaccinés avec des virus atténués [233–235].

L'utilisation d'inhibiteurs généraux d'IFNAR pour favoriser la réplication du virus dans les cellules tumorales conduit donc à une impasse. Il faut donc trouver une stratégie pour bloquer la signalisation IFNAR dans les cellules tumorales sans inhiber celle des cellules saines pour les protéger et induire une réponse anti-tumorale efficace. (Figure 22). L'approche développée au cours de ma thèse cherche à répondre à cet enjeu.

5 Manipulation de la voie IFN de type I

Malgré la pléthore d'activités antivirales et immunomodulatrices, ayant une utilité dans le cadre d'une infection virale ou d'un processus tumoral, de nombreux effets délétères sont causés par les IFN de type I. Ces effets peuvent être en lien avec diverses pathologies auto-immunitaires, hématologiques et même neurodégénératives. Les IFN de type I peuvent aussi avoir un impact dans des approches thérapeutiques telles que la virothérapie antitumorale.

Une neutralisation spécifique de la voie IFN sur des populations cellulaires particulières permettrait de limiter les effets indésirables des IFN, tout en permettant le fonctionnement de la réponse immunitaire modulée par les IFN de type I.

5.1 Historique de la neutralisation des IFN de type I

Le développement d'outils neutralisant la réponse IFN de type I peut servir à comprendre les mécanismes associés à cette réponse ainsi que comme traitement dans les maladies caractérisées par une réponse IFN de type I exacerbée. Ces antagonistes peuvent être des immunoglobulines ou des molécules synthétiques (Figure 23).

Grâce aux processus naturels d'immunisation, il est possible d'obtenir chez des souris des anticorps réactifs pour une des sous-unités d'IFNAR. Des travaux princeps ont permis d'obtenir des anticorps circulants véhiculant du sérum de souris porteuses de tumeurs transfectées avec l'IFNAR1 humain. Ces sérums démontraient une capacité à neutraliser l'activité antivirale et antiproliférative de l'IFN dans une lignée Daudi humaine [236]. Quelques temps plus tard, apparurent les premiers anticorps monoclonaux (mAbs) ciblant l'IFNAR1 murin, notamment les clones MAR1. Cette fois-ci, l'immunisation fût possible à travers le transfert d'un plasmide codant pour l'ectodomaine d'IFNAR1 dans des souris IFNAR1^{-/-}. Suite à cette immunisation, 5 mAb furent isolés du sérum des souris, le MAR1-5A3 présentait la meilleure capacité pour neutraliser les activités antivirales, antibactériennes et immunostimulantes des IFN de type I [237]. Depuis, d'autres mAb ciblant l'IFNAR1 humain ont été obtenus comme l'Anifrolumab.

L'utilisation de mAb anti-IFNAR1 comme MAR1-5A3 ou l'Anifrolumab peut avoir des implications dans la thérapie de maladies auto-immunitaires comme le LES. La

neutralisation de la réponse IFN dans des modèles de LES murin provoque un ralentissement de la maladie, diminuant le recrutement de la réponse immunitaire dans les tissus touchés par le lupus [238,239].

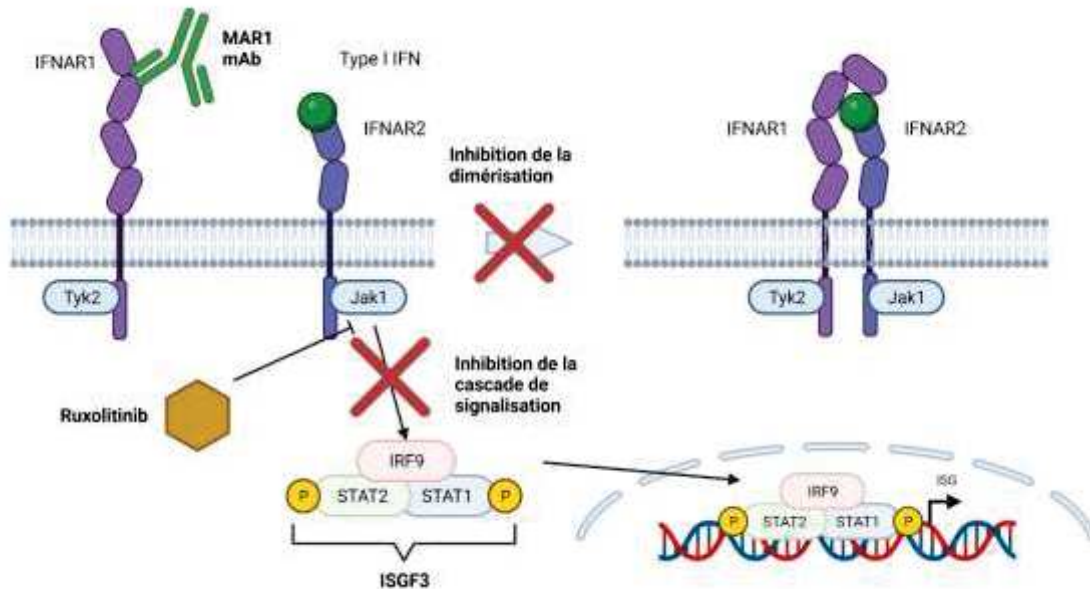


Figure 23 Neutralisation d'IFNAR par des molécules thérapeutiques. Des antagonistes de la signalisation d'IFNAR peuvent agir sur la neutralisation du récepteur, comme dans le cas des mAb, ou neutraliser la cascade de signalisation, comme le ruxolitinib

Cependant la neutralisation de la voie IFN de type I n'est pas exclusive à l'utilisation de mAb ciblant les ectodomains du récepteur. La neutralisation des kinases associées aux domaines cytoplasmiques peut être une stratégie aussi efficace. Le ruxolitinib (Jakavi®) est un mimétique de l'ATP, inhibiteur des kinases Janus Jak1 et Jak2 et approuvé dans le traitement de la myélofibrose, un type de cancer de la moelle osseuse caractérisé par la prolifération anormale de la lignée myéloïde [240]. La signalisation des réponses IFN de type I et II étant dépendantes de l'action de Jak1 et Jak2, le ruxolitinib exerce un fort impact dans la réponse immunitaire antivirale et antitumorale, sensibilisant les patients aux infections virales et bactériennes et induisant une immunosuppression [241,242].

5.2 Activation de la signalisation IFNAR dans un type cellulaire particulier

Une solution à la problématique antérieure serait le développement de molécules thérapeutiques capables de moduler la signalisation IFNAR, soit en l'activant ou en la neutralisant, sur un type cellulaire particulier. Nous pourrions imaginer donc une stratégie thérapeutique permettant l'activation spécifique des cellules immunitaires responsables de l'immunité antivirale ou antitumorale tout en neutralisant la signalisation IFNAR dans les cellules cancéreuses, permettant aux OV de les lyser spécifiquement, sans atteindre les tissus sains.

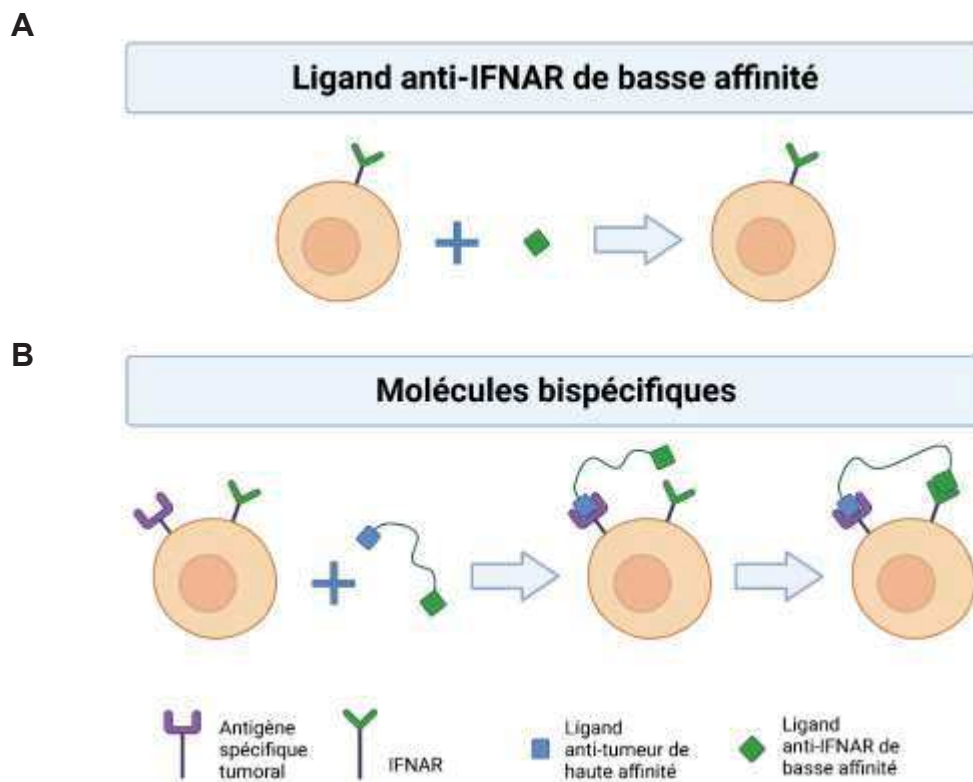


Figure 24 Fonctionnement de notre stratégie de ciblage. Les molécules bispécifiques conçues pour la modulation cellule-spécifique d'IFNAR permet la fixation du ligand de basse affinité par un phénomène d'avidité. La fixation du VHH de haute affinité à sa cible permet l'ancrage de la molécule bispécifique à la surface de la cellule ciblée. Ceci facilite l'interaction du ligand à IFNAR, permettant leur interaction uniquement dans les cellules exprimant un marqueur cellulaire déterminé.

Pour cela, nous avons conçu des molécules bispécifiques formées par deux fractions : une fraction ciblant IFNAR capable de se fixer avec une basse affinité à ce récepteur et de l'activer ou le neutraliser (Figure 24A) et une fraction de ciblage, sous forme de nanobody, capable de se fixer avec une haute affinité à un marqueur cellulaire particulier. Cette molécule bispécifique exercerait une activité activatrice ou inhibitrice d'IFNAR uniquement sur les cellules exprimant le marqueur cellulaire reconnu par la

fraction de ciblage. Suite à la fixation du VHH de haute affinité à l'antigène ciblé, la molécule est ancrée à la surface de la cellule facilitant l'accès à de nombreuses sous-unités IFNAR1 (phénomène d'avidité), stabilisant leurs interactions avec le ligand de basse affinité et permettant l'inhibition d'IFNAR (Figure 24B).

La conjugaison d'un VHH de haute affinité et d'un IFN- α 2 mutant de basse affinité permet la création d'agonistes ciblés connus comme AcTaFeron (« Activity-on-Target cytokines »), activant la signalisation IFNAR uniquement dans des types cellulaires particuliers (Figure 25). L'équipe du Dr Uzé a créé un type de ces molécules, composé par un VHH anti-leptine, un linker PASylée et un IFN α -2 mutant, incapable de se fixer à IFNAR dû à sa basse affinité. Ce type de molécule possède une EC₅₀ 1000 fois plus élevée pour induire la signalisation IFNAR sur des cellules HL116 exprimant le récepteur de leptine mLR10, en comparaison des cellules HL116 WT [243]. Ce potentiel de ciblage est dépendant de l'affinité du VHH de ciblage pour sa cible et de l'affinité de l'IFN- α 2 mutant pour IFNAR.

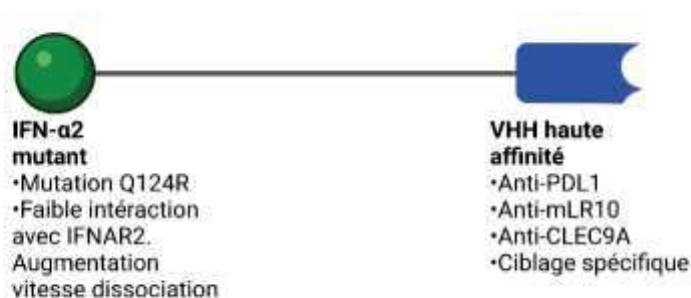


Figure 25 Structure des AcTaferons. Ces agonistes ciblés d'IFNAR sont constitués par un IFN de type I mutant, de faible affinité pour le récepteur, et d'un nanobody (VHH) de haute affinité reconnaissant un marqueur de surface exprimé sur les cellules que nous voulons cibler.

L'activation spécifique de la voie IFN peut-être une stratégie très avantageuse dans l'immunothérapie antitumorale. L'utilisation des IFN de type I était une approche intéressante dans le traitement de certains cancers comme le mélanome. Cependant, ce genre de traitement présente de nombreux effets secondaires systémiques ce qui limite leur utilisation. Le ciblage de la signalisation IFNAR directement dans les cellules immunitaires pertinentes, comme les DC, permet de les activer afin d'initier une réponse immunitaire antitumorale [244]. La combinaison avec d'autres stratégies immunothérapeutiques comme des inhibiteurs du point de contrôle ou l'administration

de $TNF\alpha$, améliore cet effet, induisant une régression tumorale totale est l'immunisation de la souris contre l'implantation de nouvelles tumeurs [244](Figure 26).

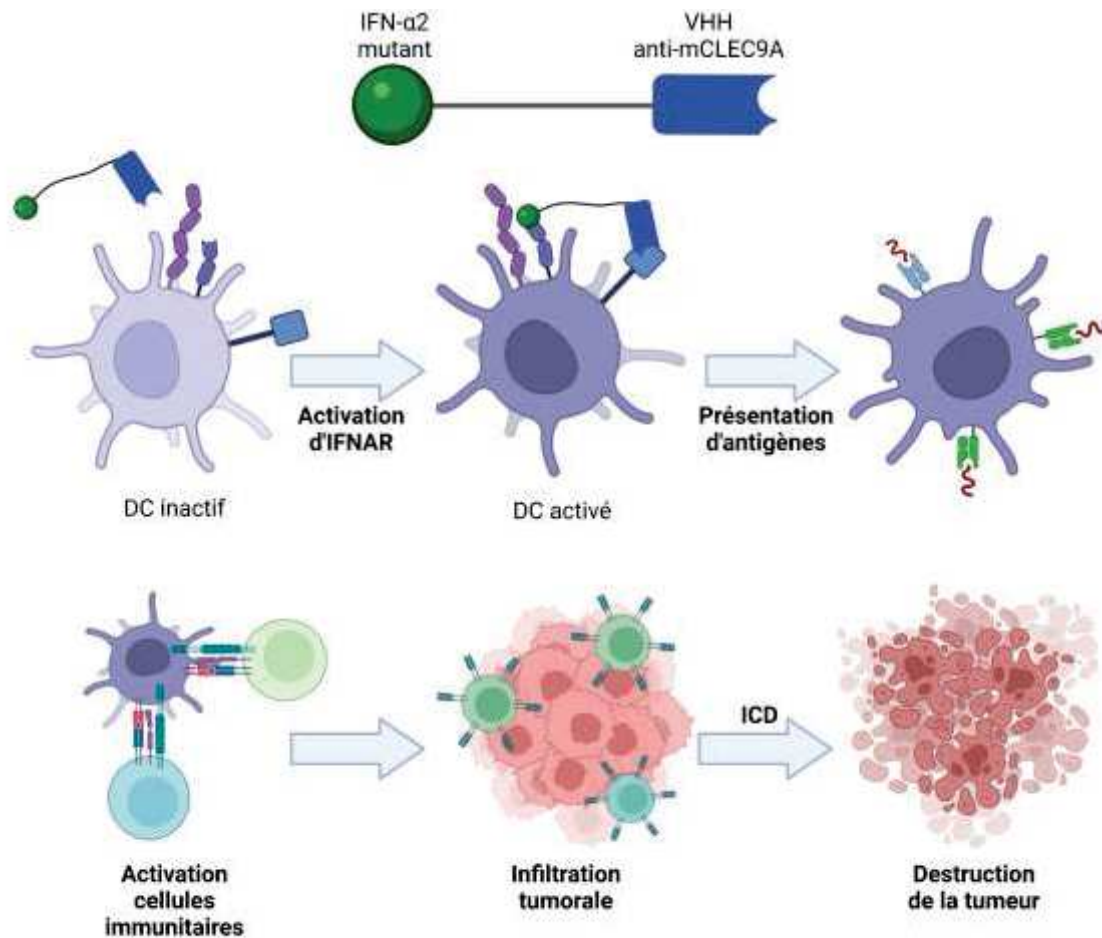


Figure 26 Induction de la réponse antitumorale par l'action spécifique des IFN de type I sur les DC. Les AcTaferons sont capables de délivrer une activité IFN de type I spécifiquement dans des cellules CLEC9A+ in vivo. L'activation de DC CLEC9A+ induit la présentation d'antigènes tumoraux aux autres cellules immunitaires effectrices. Ceci à son tour provoque la destruction de la tumeur.

5.3 Inhibition de la signalisation d'IFNAR dans un type cellulaire particulier

Suite à la validation de cette approche de ciblage, dans le cadre de l'activation d'IFNAR, l'étape suivante était de réaliser l'action inverse, neutraliser la signalisation IFNAR sur un type cellulaire particulier, en utilisant la même stratégie de ciblage. Cela fut l'objectif de ma thèse.

6 Objectifs

Comme évoqué, la réponse IFN de type I joue un rôle ambivalent dans le contexte de l'oncolyse virale. Elle limite la toxicité induite par le virus oncolytique dans les tissus sains, mais elle limite souvent aussi sa réplication dans les cellules tumorales. Les IFN de type I sont également étroitement impliqués dans la réponse immunitaire antitumorale. Lors de l'utilisation de virus oncolytique, la stratégie idéale serait alors de bloquer la signalisation IFNAR seulement dans les cellules tumorales, tout en préservant cette signalisation dans les tissus sains. L'objectif principal de ma thèse était de mettre en œuvre cette stratégie.

Mon projet était divisé en deux parties. La première partie avait pour objectif de faire la preuve de concept que la signalisation IFNAR peut être bloquée sur un type cellulaire particulier *in vivo* grâce à des conjugués de nanobody. La deuxième partie avait pour objectif d'appliquer cette nouvelle stratégie de neutralisation ciblée pour bloquer l'IFNAR des cellules tumorales dans le contexte de l'oncolyse virale par le VSV. Dans cette deuxième partie, j'ai aussi validé cette stratégie à l'aide d'un modèle expérimental *in vivo* de tumeurs IFNAR1_{KO}.

1. L'objectif de la première partie de ma thèse était d'obtenir des molécules recombinantes capables de neutraliser la signalisation IFNAR de manière cellule-spécifique. Nous avons utilisé une stratégie similaire à celle de l'IFN- α 2 ciblé (Garcin, Cawels). Des lamas ont été immunisés afin d'obtenir ensuite par phage display des nanobodies de basse affinité dirigée contre IFNAR1 (Figure 27A). Plusieurs candidats de basse affinité furent fusionnés à des nanobodies anti-CD20 murin de haute affinité à l'aide d'un linker PASylé afin d'augmenter la taille de l'antagoniste et sa biodisponibilité (Figure 27B). Lors de ma thèse, j'ai étudié *in vitro* et *in vivo* le potentiel de ciblage de ces molécules afin d'inhiber la signalisation IFNAR uniquement sur les lymphocytes B. Cette stratégie de neutralisation a été également confirmée sur un second type cellulaire, les DC CD8⁺ CD11c⁺ Clec9a⁺, où la signalisation IFNAR pouvait être spécifiquement bloquée *in vitro* et *in vivo*.

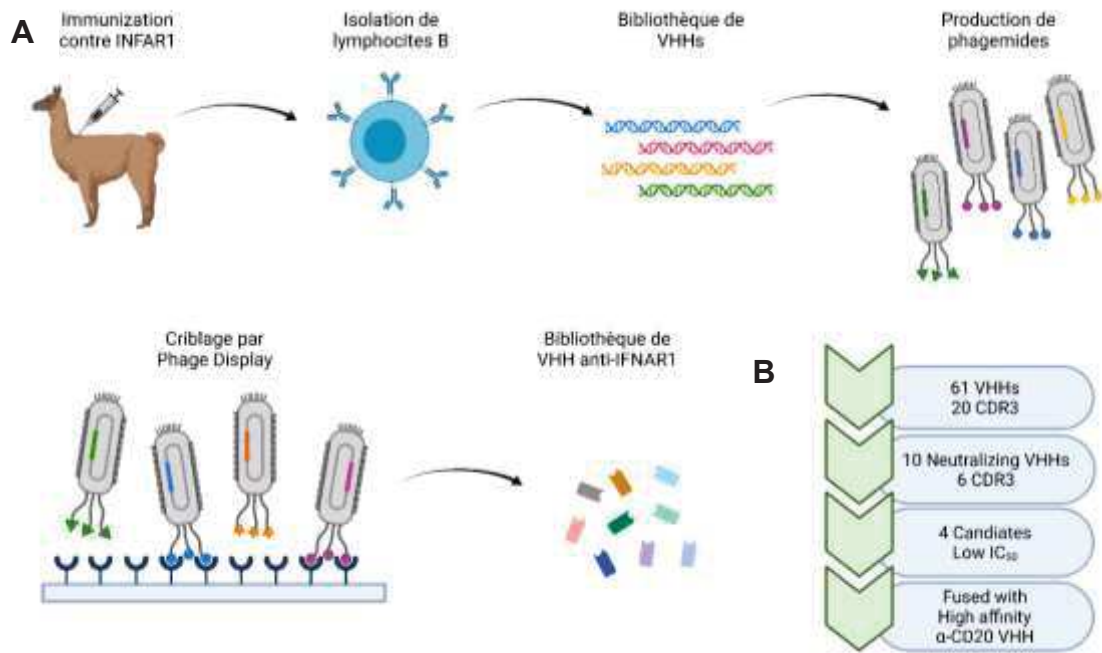


Figure 27 Obtention de VHH anti-IFNAR1. A travers la technique de phage display, nous avons criblé et obtenu un panel de nanobodies (VHH) anti-IFNAR1, utilisées et recombinées pour la stratégie de modulation de la voie IFN présentée dans ce projet.

2. Dans la seconde partie de ma thèse, j'ai voulu déterminer si ce nouveau type d'antagoniste d'IFNAR peut cibler les cellules tumorales, afin de réduire leur défense antivirale et ainsi augmenter la réplication et donc l'activité oncolytique du VSV. Nous avons donc fusionné le nanobody de basse affinité spécifique d'IFNAR1 avec un nanobody de haute affinité reconnaissant le hCD20 à l'aide d'un linker PASylé (Figure 28). J'ai ensuite testé in vitro le potentiel de ciblage de ces molécules sur des lignées tumorales murines exprimant ou non le hCD20 humain (mésothéliome AK7 et mélanome B16). J'ai testé en particulier la capacité de l'antagoniste à sensibiliser seulement les cellules tumorales hCD20+ à la lyse par le VSV. J'ai ensuite déterminé in vivo si cet antagoniste pouvait être utilisé pour augmenter la réplication du VSV dans la tumeur et son efficacité oncolytique dans le modèle de mésothéliome AK7 hCD20+ dans les souris C57BL/6. Après l'injection intrapéritonéale de cellules AK7 dans des souris C57BL/6, les cellules tumorales colonisent l'omentum pour former une tumeur solide de grande taille, ainsi que de nombreux nodules dans divers tissus connectifs, notamment sur le mésentère. En parallèle de cette étude, j'ai étudié si l'inactivation d'IFNAR1 par la

technique CRISPR-cas9 rendait les tumeurs intrapéritonéales AK7 sensibles à l'activité oncolytique du VSV in vitro et in vivo.

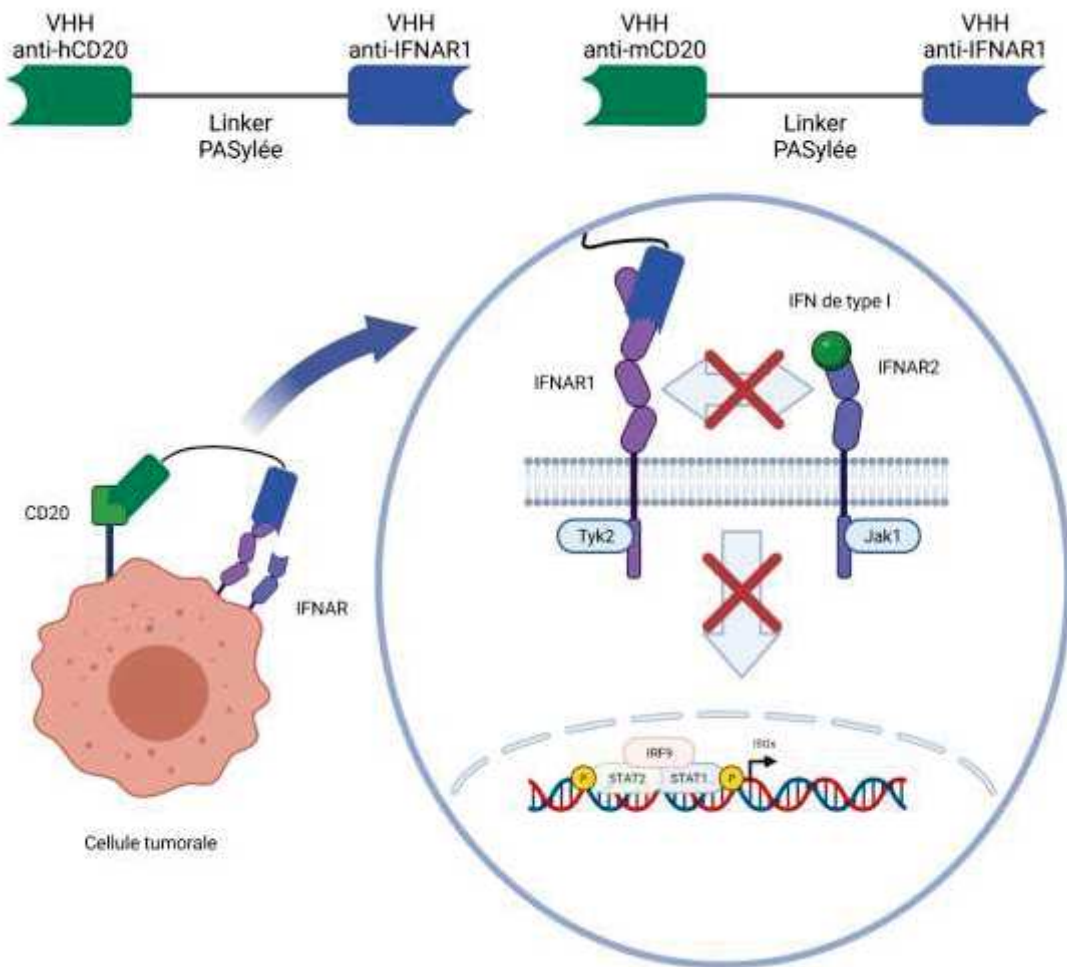


Figure 28 De manière similaire aux agoniste ciblés, les antagonistes ciblés d'IFNAR sont constitués par une fraction de ciblage sous forme de VHH de haute affinité pour un marqueur cellulaire spécifique, une fraction sous forme de VHH de basse affinité pour IFNAR et un linker reliant les fractions.

A tumor-targeted interferon-alpha/-beta receptor 1 antagonist increases replication of the vesicular stomatitis virus in a mouse mesothelioma model.

Thomas Ogor^{1,2}, Yann Bordat¹, Geneviève Garcin^{1§}, Camille Chatelain^{2,3},
Virginie Dehame^{2,3}, Sophie Deshayes^{2,3}, Nicolas Boisgerault^{2,3}, Jan Tavernier⁴,
Jean-François Fonteneau^{2,3*} and Gilles Uzé^{1§}.

1 Université de Montpellier, LPHI, 34000 Montpellier, France

2 Université de Nantes, Inserm, CRCINA, F-44000 Nantes, France

3 Labex IGO, Immunology Graft Oncology, 44007 Nantes, France

4 Cytokine Receptor Laboratory, VIB Medical Biotechnology Center, Ghent
University, 9000,

§ Present adress : Université de Montpellier, INSERM, IRMB, 34000 Montpellier,
France

* Corresponding author.

Abstract

Type I Interferons (IFN I) are a group of cytokines with pleiotropic activities involved in the antiviral and antitumor immune responses. However, their antiviral activity can act as a double-edged sword in the context of antitumor virotherapy, since they can reduce oncolytic virus replication in tumor cells by inducing expression of interferon stimulated genes with antiviral function. In order to specifically neutralize the IFN- α /- β receptor (IFNAR) on a particular cell type, novel targeted IFNAR1 antagonists were created under the form of recombinant molecules that are composed of a high affinity nanobody targeting a cell-specific cell marker conjugated to a low affinity blocking nanobody targeting IFNAR1. We first show *in vitro* and *in vivo* that such an antagonist targeting the murine CD20 is able to inhibit IFNAR signaling only in B cells among splenocytes. We then assessed if this antagonist targeted toward the human CD20 (hCD20) is able to improve oncolytic activity of the vesicular stomatitis virus against murine hCD20+ tumor cell lines. We showed *in vitro* that the antagonist is able to block IFNAR signaling and induce VSV oncolytic activity against IFN- α 11-treated AK7 mesothelioma or B16 melanoma cells only if they express hCD20. *In vivo*, we show that the antagonist enhances VSV replication in hCD20+ AK7 mesothelioma tumor and modestly increases mice survival compared to animals treated only with VSV. Altogether our results show that it is possible to block IFNAR signaling with a targeted IFNAR1 nanobody.

Introduction

The type I interferon (IFN I) response allows infected cells to report *via* IFN- α and IFN- β secretion the presence of viruses to neighbouring cells and to the immune system (Schneider et al., 2014). Infected cells are able to detect viral genomes in their cytoplasm and produce IFN I in response *via* the stimulator of interferon genes protein (STING) pathway for DNA viruses and the mitochondrial antiviral-signaling protein (MAVS) pathway for RNA viruses. The interferon-alpha/-beta receptor (IFNAR), composed of the subunits IFNAR1 and IFNAR2, allows cells exposed to IFN I to express hundreds of IFN-stimulated genes (ISGs) that induce a state of antiviral resistance. Many ISGs act directly by blocking the different stages of the viral cycle, from the entry of the virus, through the inhibition of its replication, to the release of its progeny by the infected cell. The IFN I also play a crucial role in the induction and the regulation of the antiviral adaptive immune response, notably by favouring antigen cross-priming by dendritic cells (Crouse et al., 2015; Schiavoni et al., 2013).

Oncolytic immunotherapy is a therapeutic approach based on oncolytic viruses (OVs) (Kaufman et al., 2015). OVs are non-pathogenic replicative viruses that preferentially replicate in and kill tumor cells without harming healthy cells. Furthermore, replication of OVs in tumor cells leads to immunogenic cell death that can induce the infiltration of tumors and reinforces the antitumor immune response, notably through the induction of the IFN I response (Achard et al., 2018).

Some OV such as attenuated strains of measles virus (MV) or vesicular stomatitis virus (VSV) are sensitive to antiviral properties of IFNAR signaling (Achard et al., 2015; Delaunay et al., 2020; Kurokawa et al., 2018; Stojdl et al.,

2000a). In tumor cells with defects of IFNAR signaling, IFN I are not able to block OV replication (Stojdl et al., 2000a), whereas in tumor cells without defect of IFNAR signaling, IFN I may limit viral replication and thus oncolytic activity (Achard et al., 2015; Delaunay et al., 2020; Fend et al., 2017). Furthermore, IFN I response is often activated in tumors, as reported by a recent analysis of 31 cancers *via* The Cancer Genome Atlas (TCGA) database by Liu H et al that analysed the intensity of an IFN I signature based on the expression of 38 ISGs (Liu et al., 2019). This constitutive IFN I response found in some tumors have been shown to limit oncolytic efficacy (Kurokawa et al., 2018).

Thus, IFN I response is a double-edged sword for oncolytic immunotherapy. On one hand, the induction of IFN I response by OV inflames the tumor environment and participated in the induction of an adaptive antitumor immune response. Furthermore IFN I protect healthy tissue from viral replication. On the other hand, a pre-existing or an OV-induced IFN I response may quickly shut down the replication and spreading of OV inside tumors. Therefore, it would be interesting to design a strategy to transiently block IFNAR signaling and thus ISG expression only in tumor cells while treating by OV. This strategy would enhance viral replication in tumor cells, while preserving positive effects of IFN I on the protection of healthy tissue and the induction of the antitumor immune response.

Recently, we reported a strategy to induce IFNAR signaling only in a particular cell type (Garcin et al., 2014). This strategy consists in a mutated IFN- α 2 with a lower affinity to IFNAR compared to natural IFN- α 2. This mutated IFN- α 2 is then conjugated to a single variable domain on a heavy chain antibodies (VHHs), also known as nanobody that recognizes specifically a marker

expressed by the targeted cell type. Using a mutated IFN- α 2 conjugated to a nanobody that recognize Clec9a, we showed that this targeted agonist induces *in vitro* and *in vivo* IFNAR signaling only in CD8⁺ CD11c⁺ dendritic cells that also express Clec9a (Cauwels et al., 2018). In the present study, we used a similar strategy to target the binding of a neutralizing nanobody and block IFNAR signaling in particular cell types. Thus, we designed a cell-targeted IFNAR1 antagonist under the form of a conjugate of two nanobodies. The first nanobody recognizes a specific cell surface marker and the second inhibits IFNAR signaling only if the first nanobody is bound. We first show, *in vivo*, with a murine CD20 (mCD20) targeted IFNAR1 antagonist, that our strategy is able to block IFNAR signaling, after IFN I intravenous injection, only in mCD20⁺ splenocytes B. We then show that a tumor cell-targeted IFNAR antagonist can be used to enhance modestly VSV replication and oncolytic activity in the orthotopic AK7 peritoneal mesothelioma mouse model.

Results

Designing cell-targeted IFNAR1 antagonists

The first step of the project was to obtain recombinant IFNAR1 antagonist nanobodies capable of neutralising the IFNAR1 signaling with low affinity. Lamas were immunized against the murine IFNAR1 protein to obtain a library of 61 VHH candidates with 20 different CDR3 region groups, of which 10 were deemed neutralizing (Figure 1A). Four IFNAR1 neutralizing VHH candidates were then fused, through a 20X GGS linker, with a second VHH that targets with high affinity the mouse CD20 (mCD20) or the human CD20 (hCD20) surface markers (Cauwels et al., 2017). The capacity of the four mCD20-targeted IFNAR1 antagonists to block STAT1 phosphorylation and thus IFNAR signaling specifically in CD19+CD20+ B cells was measured *in vitro* on splenocytes exposed to IFN I (Figure 1B-D). CD19 was used to discriminate B cells since CD20 is masked by the antagonist. This allowed us to obtain two targeted antagonists with a high targeting potential: candidate-3 and candidate-4 with an IC_{50} 1447 and 3444 fold smaller on mCD20+ cells than on mCD20- cells, respectively. For the rest of the study, we used the mCD20- and hCD20-targeted IFNAR1 antagonists obtained with candidate-3, since this nanobody has a lower IC_{50} (0,06 nM) than the candidate-4 (0,34 nM) on targeted cells. For further studies, the 20X GGS linker of this construct was replaced with a 300 amino acids PASyled linker in order to increase the *in vivo* half-life when injected into mice (Schlupschy et al. 2013)

The mCD20-targeted IFNAR1 antagonist is able to neutralize the IFNAR signaling only in B cells in vivo

After obtaining a functional B cell-targeted IFNAR1 antagonist *in vitro*, we sought to test its capabilities *in vivo*. We co-injected intravenously a natural mix of IFN I five minutes after the mCD20-targeted IFNAR1 antagonist to inhibit IFNAR signaling only in murine CD19⁺CD20⁺ B cells (Figure 2A). We then measured on collected splenocytes the expression of ISG54 and PD-L1 by flow cytometry. Both are interferon-stimulated gene (ISG) and are thus good indicators of IFNAR signaling (Figure 2B and 2C). Results showed that CD19⁺ B cells representing 35% of total splenocytes were not able to express PD-L1 and ISG54 when receiving IFN I and the mCD20-targeted IFNAR1 antagonist, whereas all CD19⁻ splenocytes express these two ISGs at a level similar to what is observed in the IFN I-treated control mice. The mCD20-targeted IFNAR1 antagonist is able to totally inhibit IFNAR1 signaling in B cells *in vivo*.

We then confirmed that our approach can be used to target other cell subsets such as Clec9A⁺ dendritic cells (DC) (Supplemental Figure 1). Clec9A⁺ DC can be discriminated among the splenocytes by the co-expression of CD8 and CD11c. We showed *in vivo* after IFN I injection that a Clec9A-targeted IFNAR1 antagonist is able to block IFNAR signaling only in CD8⁺CD11c⁺ DC among splenocytes.

The hCD20-targeted IFNAR1 antagonist is able to neutralize IFN I signaling in hCD20⁺ mouse tumor cell lines

Having validated the targeting potential of the IFNAR1 antagonists on different mouse splenocyte subsets, we sought to test this IFN I neutralization

approach on murine tumor cell lines. Our strategy relies on the successful recognition of a tumor antigen in order to specifically neutralize IFN I activity on tumor cells while sparing IFNAR from healthy tissues. We chose to target a surface marker of human origin removing the possibility for the targeting moiety to bind to mouse cells *in vivo*. Thus, we engineered a recombinant IFNAR1 antagonist that binds to the human CD20 protein (hCD20). The mesothelioma AK7 and melanoma B16 cell lines were transfected with a plasmid encoding the hCD20. They both expressed strongly this marker (Supplemental Figure 2).

The next step was to assess whether the hCD20-targeted IFNAR antagonist is able to neutralize the activity of IFN I in the two hCD20+ cancer cell lines (Figure 3). The hCD20-targeted IFNAR1 antagonist was able in a dose-dependent manner to neutralize the expression of ISG54 and PD-L1 specifically on the hCD20 expressing AK7 and B16 cancer cell lines with an IC₅₀ inferior to 1 nM. In comparison, this neutralization was not observed in the non-hCD20 AK7 and B16 control cell lines.

The hCD20-targeted IFNAR1 antagonist is able in vitro to neutralize the antiviral effects of IFN I specifically on hCD20 expressing cells

One of the main concerns for effective cancer virotherapy is the possible sensibility of tumor cells to the antiviral effects of IFN I that reduces viral replication and oncolytic activity. Thus, we wanted to determine if the hCD20-targeted IFNAR antagonist was able to block IFNAR signaling only on hCD20 expressing tumor cells to restore the oncolytic activity. As an OV, we used VSV, a rhabdovirus that harbors an extremely low toxicity in IFN-competent experimental models (Trottier et al., 2005; Westcott et al., 2015).

While IFN- α 11-treated control cells were completely protected from the oncolytic activity of VSV, the hCD20-targeted IFNAR antagonist was able to specifically neutralize the antiviral properties of IFN I only in hCD20 expressing tumor cells (Figure 4). Indeed, hCD20-expressing B16 or AK7 cell lines that were treated with as little as 10 nM or 3 nM of hCD20-targeted IFNAR1 antagonist were entirely killed by VSV 48h post-infection, respectively. The neutralizing action of the antagonist was not observed in B16 or AK7 cells that do not express hCD20. Altogether, our results show that the hCD20-targeted IFNAR1 antagonist is able to block IFNAR signaling and to sensitize only hCD20+ tumor cells to VSV oncolytic activity.

VSV injection in mice induces IFN I secretion and IFNAR1 signaling in tumor and spleen

To assess the induction of IFN I secretion and ISG expression *in vivo* after VSV injection, we used the syngeneic intraperitoneal AK7 mesothelioma model in C57/BL6 female mice (Kellerman et al., 2003). This tumor model is characterized by the early colonization of the omentum and the formation of cancer cells aggregates suspended in the peritoneal cavity. Late stages of the disease display the invasion of other connective tissues, such as the mesentery and the formation of peritoneal ascites, at which point mice are euthanized.

Due to observation of ISGs expression in the tumors of untreated animals, 7 days post-implantation (data not shown), we chose to work with early tumors at 3 days post-implantation, in order to observe ISG expression induced by VSV. As soon as 5h after injection of 1.5×10^7 PFU of VSV through the caudal vein, we were able to detect IFN- α in the serum (Figure 5A). This IFN I production rapidly

induced ISG expression in the spleen and later in the tumor (Figure 5B). These results suggest that the hCD20-targeted IFNAR antagonist has to be used early, at the time of VSV injection, to block IFNAR signaling in tumor cells and thus enhance its oncolytic activity.

The hCD20-targeted IFNAR1 antagonist enhances VSV replication in hCD20+ AK7 tumor in vivo

We next determined if the hCD20-targeted IFNAR1 antagonist blocks IFNAR signaling and enhance VSV replication in hCD20-expressing tumors *in vivo*. We measured the expression of ISG54 and of two viral proteins, VSV-G and VSV-N, in the tumor and spleen of mice bearing hCD20+ AK7 tumor that received 1.5×10^7 PFUs of VSV alone or combined with two injections of 10 μ g of the antagonist. Due to the binding competition between the APC-H7 labelled anti-hCD20 flow cytometry antibody and the recombinant hCD20-targeted IFNAR1 antagonist in the conditions where animals received both IFN I and the antagonist (Supplemental Figure 3) tumor cells were gated using granularity (SSC) and size (FSC) parameters as well as selecting for non-immune CD45- cells. 24h after treatment, tumors were collected, dissociated and the expression of ISG54 was measured in CD45- tumor cells and CD45+ non-malignant cells from the tumor microenvironment (Figure 6A). ISG54 expression was blocked by the hCD20-targeted IFNAR1 antagonist in CD45- cells, whereas no blocking was observed in CD45+ cells. 24h after treatment, VSV-G and VSV-N expression was respectively 160 fold and 250 fold greater in hCD20+ AK7 tumors from mice that received the combination compared to mice that received the VSV alone (Figure 6B). We also observed a smaller increase of VSV-G (10-fold) and VSV-N (8-fold)

expression in the spleen of animals that received the combination. This indicates that the use of an hCD20-targeted IFNAR1 antagonist enhances VSV replication in hCD20-expressing AK7 tumors. However, these results also suggest that the increased replication of VSV in tumors spill over in the mouse organism, reaching the spleen.

The combination of VSV and the hCD20-targeted IFNAR1 antagonist slightly increases survival of mice bearing hCD20+ AK7 tumor

In a first survival experiment, we observed signs of neurotoxicity, in the shape of hind legs paralysis, in hCD20+ AK7 tumor-bearing mice two to three days after receiving the hCD20-targeted IFNAR1 antagonist and 1.5×10^7 PFUs of VSV (Supplemental Figure 4). In this experiment, we hypothesized that the hCD20+ AK7 tumors that received the VSV and the antagonist could act as a replication reservoir for the virus, that amplify the global viral charge to levels that induce neurotoxicity. Hence, in a second experiment, we chose to reduce the dose of VSV to 1.5×10^6 PFUs, in order to avoid the previously observed side effects (Figure 7A). However, we observe a modest increase of the survival of mice that received the combination in comparison to mice treated with VSV alone, but this increase was not statistically significant ($p = 0.0513$, Figure 7B).

Discussion

In this study, we show *in vitro* and *in vivo* that it is possible to block IFNAR signaling in a particular cell type using an antagonist formed of a conjugate of two nanobodies specific for a cell specific marker and IFNAR1. We also demonstrate that this antagonist can be used to block IFNAR signaling specifically in tumor cells. In mice treated by oncolytic VSV, the antagonist allows a better replication of the virus in tumors that results in a modest extension of survival.

These cell-targeted antagonists could be interesting tools to study *in vivo* the contribution of IFNAR signaling on different cell types, especially immune cells, in the context of infection or cancer. It would be a time-saving and cost-effective alternative in comparison of mouse engineering of IFNAR knock down on particular cell types. Furthermore, this cell-targeted antagonists can be used in parallel of cell-targeted activators of IFNAR signaling. Indeed, we previously produced conjugates of a mutated IFN- α 2 and nanobodies specific for different cell markers that allow to turn on IFNAR signaling in specific cell types (Cauwels et al., 2017, 2018; Garcin et al., 2014).

In this study, after tumor dissociation and flow cytometry, we showed that IFNAR signaling in CD45+ non-malignant cells from the tumor is not blocked by the hCD20-targeted IFNAR1 antagonist, contrary to CD45- tumor cells. This result suggest that we preserve IFNAR signaling on non-malignant cells, especially immune cells. Indeed IFN I play a major role in the induction of anti-tumor immune response, especially by activating antigen presenting cells (Cauwels et al., 2018; Diamond et al., 2011; Fuertes et al., 2011) or NK cells (JB et al., 2007). Thus, the tumor cell-targeted IFNAR1 antagonist should preserve

IFNAR signaling in these immune cells allowing to keep their involvement in the induction of an antitumor response.

Surprisingly, the better VSV replication in tumors of animals treated with VSV and the antagonist didn't lead to an increase of the survival suggesting that other factors besides IFNAR signaling are able to limit VSV oncolytic activity *in vivo*. However, the replication and the survival experiments are difficult to compare. Indeed, the increased VSV replication was observed 24h after we treated the mice with $1,5 \times 10^7$ infectious viral particles and the antagonist. With this dose of VSV, we observed toxicities of the combination that led to neuropathologic symptoms that are characteristic of VSV toxicity. We hypothesize that VSV produced in the tumor spill over in mouse organism and reach toxicity level. When reducing the VSV dose by 10 fold ($1,5 \times 10^6$), the combination is able to modestly increase mice survival, but we have no proof that at this dose of VSV there is an increased replication in the tumor. This dose may be too low for enough VSV to reach it. One possibility to reduce VSV toxicity when used at high dose would be to use a VSV with a replication that is more restricted to the tumor, such as the VSV Δ 51 (Stojdl et al., 2003a). This virus is more sensitive to IFNAR signaling and may exhibit less neurotoxicity when its replication is increased in tumor. Another possibility is the loss of expression of the hCD20 by part of the tumor cells that would become resistant to the combination of VSV and the antagonist. Further studies are required to better understand this discrepancy between viral replication and lack of survival benefit.

Finally, the duration of IFNAR neutralization may be a key point in this type of strategy. How long must VSV be able to replicate in the tumor to effectively induce rejections? We must ensure enough lytic action from the virus in order to

release enough damage associated molecular patterns (DAMPs) to enable an effective immune response (Russell et al., 2019). However, we must also be cautious about the priming of a too strong antiviral immune response that may hinder viral oncolytic therapy. Further work is needed in order to verify if the limited effectiveness of our combinatory therapy is due to a potent antiviral immune response.

Materials and methods

Tumor cell lines

hCD20+, mCD20+ and unmodified B16 mouse melanoma cell lines were cultured in DMEM culture medium supplemented with 10% FBS, glutamine and penicillin/streptomycin [238]. hCD20+ and hCD20- AK7 cell lines were cultured in RPMI medium supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine and 100 U/ml penicillin/ 100 µg/ml streptomycin. hCD20+ AK7 clones were obtained by transfection of an hCD20 expressing plasmid [238] and selection with 300 µg/ml of G418. A sub-clone stably expressing hCD20 when implanted *in vivo* was obtained after 18 days of growth in C57/BL6 mice.

VSV production and purification

VSV (Indiana strain) was produced and purified as previously described [245]. Briefly, BHK cells were seeded and transfected with a plasmid encoding the VSV genome and three accessory plasmids coding for the N, P and L viral proteins. Cells are then infected with a Vaccinia Virus coding for T7 for 1 hour. The supernatant of the cells was collected 24h later and filtered at 0.2 µm. VSV was then amplified on BHK cells for 24h. Then, the supernatant containing the VSV particles is ultracentrifugated at 100,000 g for 1h on a 10% sucrose PBS cushion twice. The viral particles were titrated by plaque forming assay, and stored at -80°C.

Targeted IFNAR1 antagonist production and purification

Lamas were immunized against the ectodomain of a His-tagged IFNAR1 subunit. Peripheral blood was collected and the total RNA of lymphocytes was extracted and used as a template for cDNA synthesis. The obtained VHH cDNA

library was then screened for IFNAR1-targeting VHHs by phage display screening technique. By recombinant engineering, the anti-IFNAR1 VHHs were fused with a high affinity anti-mCD20 or anti-hCD20 VHH [232,238]. Both VHHs were connected with either a 20-fold GGS motif linker or a PASylated linker composed of 300 amino acids (15 repeats of the motif PAAPAPSAPAASPAAPAPAS) [162].

Type I interferons

Two types of IFN I were used: IFN α -11 and a natural mix of IFN I (IFN α and IFN β). IFN α -11 was obtained by protein production from HEK cells transfected with a plasmid coding for a recombinant IFN α -11 with a His-tag and a C86S mutation [231]. The natural mix of IFN I was obtained by infecting C243 cells with Newcastle disease virus (NDV) and subsequently purifying the supernatant for IFN I [246].

Cytopathic effect measurement

10,000 AK7 or 5,000 B16 cells were seeded in 96-well flat bottom plates. The day after seeding, cells are incubated 30 minutes with the targeted antagonist, followed by exposition to 100 U/ml of IFN α -11 in a 37°C incubator. After 24hrs of incubation with the antagonist and/or IFN- α 11, tumor cells are exposed to VSV at an MOI of 0.12 for AK7 and 0.6 for B16 cell lines. After 48h of infection, cells were fixed and stained with a solution of 0.125% crystal violet, 3.7% PFA and 0.15 nM NaCl for 10 minutes at room temperature. After drying, crystal violet is made soluble with 0.2% Triton X-100 solution and quantified with a colorimeter at 570nm.

Animals

Female C57/BL6N and Balb/c mice (Charles River) of 8 weeks of age or more were used in the *in vivo* experiments. All animal experiments were approved by the local ethics committee (project granted by the French Ministry of Research, #27051).

IFN I and mCD20-targeted antagonist treatment

Female C57/BL6 or Balb/c mice were injected with PBS, 30,000 U of the natural mix of type I IFN or a combination of 10 μ g of mCD20-targeted IFNAR1 antagonist followed 5 minutes later by 30,000 U of a natural mix of IFN I. 100 μ l was administered intravenously by the caudal vein. Mice were euthanized 17 h later and the spleens were recovered.

VSV and hCD20-targeted antagonist treatments

Human CD20+ AK7 cells were collected and washed with cold PBS. 5x10⁶ cells in 100 μ l of PBS were then injected intraperitoneally to female C57/BL6 mice. Three days after tumor implantation, mice are treated with PBS, VSV or a combination of VSV and the hCD20-targeted antagonist. 1.5x10⁶ or 1.5x10⁷ PFUs of VSV in a 100 μ l bolus are injected intravenously through the caudal vein. 10 μ g of the targeted antagonist in a 50 μ l bolus is administered intraperitoneally with additional injections 12h apart. Following euthanasia of the animals, the spleens and tumors of mice were collected. Blood was collected from isoflurane anaesthetized mice through the retro-orbital sinus capillary and deposited into 1,5

ml tubes at room temperature. After centrifugation, supernatant serums were collected and stored at -80°C for subsequent analysis.

IFN- α detection by Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay

The presence of IFN- α in mice sera was quantified by ELISA (PBL) according to manufacturer instructions. Samples were loaded into pre-coated 96-well plates and treated with proper reagents. Absorbance was then measured with a plate reader at 450 nm. Sample results were interpolated with a standard curve of IFN α -4.

Tumor and spleen dissociation

AK7 mesothelioma tumors were dissociated by an enzymatic (Gibco Collagenase I and IV) and mechanical procedure. Dissociated tumor and splenic cells were then incubated with a Fixable Viability Stain 450 (Invitrogen) viability marker for 30 minutes, on ice, protected from light. The splenocytes were next incubated with anti-mCD16/CD32 Fc Block antibodies (BD), to avoid Fc receptor-dependent binding from the flow cytometry labelling antibodies.

Flow cytometry analysis

For extracellular staining, cells were labelled with various antibodies: PE-labelled anti murine PD-L1 (Biolegend), APC-H7 labelled anti human CD20 (BD Biosciences) or PE-labelled anti murine CD45 (BD Biosciences). After extracellular staining, cells were fixated for 30 minutes at room temperature with IC Fixation Buffer (Invitrogen). After fixation, cells were subjected to two cycles of washes with Permeabilization Buffer (Invitrogen). Samples were then labelled

with rabbit polyclonal anti-ISG54 primary antibody (Invitrogen) and subsequently with an Alexa 488-labeled goat anti rabbit IgG secondary antibody (Invitrogen). In the case of pSTAT1 detection, cells were fixated with Phosflow Fix Buffer 1 (BD Biosciences) and permeabilized with Phosflow Perm Buffer III (BD Biosciences). Cells were then stained with an anti-pSTAT1 (Y701) PE-labelled antibody (BD Biosciences). Fluorescence signal was analysed with a BD FACS Canto II flow cytometer. Data were analyzed using FlowJo Software.

Immunoblotting

A BCA assay was used to quantify the concentrations of protein in the samples (Interchim). The PVDF membranes containing the samples were incubated with a solution of 0.1% TBS Tween (TBS-T) and 5% milk powder for 1 hour at room temperature, under slow agitation. The membranes are then incubated with the primary antibody (anti-ISG54 Invitrogen; anti- β actin R&D) diluted in 0.1% Tween 5% milk TBS solution. Membranes were incubated with an HRP enzyme-coupled secondary antibody solution (both anti-mouse and anti-rabbit from Interchim) diluted in 5% milk TBS. Membranes were incubated with Clarity Western ECL Substrate Revealing Kit (Bio-Rad). After incubation luminescence was read with a Bio-Rad Chemidoc MP Bio-Imager. Two channels were used in the imaging: a chemiluminescence channel to detect the light emitted by the enzymatic activity of the HRP, and a second colorimetric channel necessary for the visualization of the size ladder.

Quantitative polymerase chain reaction analysis

A Macherey-Nagel Nucleospin RNAplus Extraction kit was used for RNA extraction of the samples according to manufacturer instructions. The integrity and concentration of the RNA samples were assessed with Agilent Nano 6000 chips (Agilent). RNA samples were used to synthesise cDNA for the qPCR analysis using an M-MLV reverse transcriptase (New England). A qPCR was performed on previously obtained cDNA samples using a Maxima Sybr Green Master Mix (ThermoFisher). Samples were analysed for different gene expressions using primers designed specifically for this project (VSV-G: fw-TGCCCGTCAAGCTCAGATTT, rv-AGCATGACACATCCAACCGT; VSV-N: fw-TGTGCCTCGTTCAGATACGG, rv-CGGTTCAAGATCCAGGTCGT). The qPCR analysis was performed using a QuantStudio 3 Real-Time PCR System (ThermoFisher) at adequate T_m settings for our primers. The quantification of gene expression was normalized with Rplp₀ expression as the endogenous control.

Statistical analysis

For the ISG expression in splenocytes experiments, a non-parametric, two-tailed Mann-Whitney test with an α of 0.05 was performed. For (RT)qPCR experiments that measure the expression of several genes, a parametric, two-tailed Student test with an α of 0.05 was performed. For the survival experiments, a non-parametric Mantel-Cox test was performed.

Acknowledgements

We thank MRI (Montpellier) and Cytocell (Nantes) platforms for their expertise and support in flow cytometry analysis. The INM (Montpellier) and UTE (Nantes) animal facilities.

Funding

This research was funded by the “Foundation ARC”, the “Ligue régionale contre le cancer Grand Ouest” (CCIRGO: CD16, CD22, CD44, CD49, CD72, CD79 and CD85), “L’association ARSMESO44 ”, the “LabEX IGO” and MabiImprove programs supported by the National Research Agency via the investment of the future program ANR-11-LABX-0016-01 and Orionis Bioscience. TO is supported by the “Ligue nationale contre le cancer.

References

Achard, C., Boisgerault, N., Delaunay, T., Roulois, D., Nedellec, S., Royer, P.J., Pain, M., Combredet, C., Mesel-Lemoine, M., Cellerin, L., 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.

Achard, C., Surendran, A., Wedge, M.-E., Ungerechts, G., Bell, J., and Ilkow, C.S. (2018). Lighting a Fire in the Tumor Microenvironment Using Oncolytic Immunotherapy. *EBioMedicine* 31, 17.

Cauwels, A., Van Lint, S., Garcin, G., Bultinck, J., Paul, F., Gerlo, S., Van der Heyden, J., Bordat, Y., Catteeuw, D., De Cauwer, L., et al. (2017). A safe and highly efficient tumor-targeted type I interferon immunotherapy depends on the tumor microenvironment. *Oncoimmunology* 7.

Cauwels, A., Lint, S. Van, Paul, F., Garcin, G., Koker, S. De, Parys, A. Van, Wueest, T., Gerlo, S., Heyden, J. Van der, Bordat, Y., et al. (2018). Delivering Type I Interferon to Dendritic Cells Empowers Tumor Eradication and Immune Combination Treatments. *Cancer Res.* 78, 463–474.

Crouse, J., Kalinke, U., and Oxenius, A. (2015). Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 231–242.

Delaunay, T., Achard, C., Boisgerault, N., Grard, M., Petithomme, T., Chatelain, C., Dutoit, S., Blanquart, C., Royer, P.J., Minvielle, S., et al. (2020). Frequent Homozygous Deletions of Type I Interferon Genes in Pleural Mesothelioma

Confer Sensitivity to Oncolytic Measles Virus. *J. Thorac. Oncol.*

Diamond, M.S., Kinder, M., Matsushita, H., Mashayekhi, M., Dunn, G.P., Archambault, J.M., Lee, H., Arthur, C.D., White, J.M., Kalinke, U., et al. (2011). Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J. Exp. Med.* 208, 1989.

Fend, L., Yamazaki, T., Remy, C., Fahrner, C., Gantzer, M., Nourtier, V., Prévaille, X., Quéméneur, E., Kepp, O., Adam, J., et al. (2017). Immune Checkpoint Blockade, Immunogenic Chemotherapy or IFN- α Blockade Boost the Local and Abscopal Effects of Oncolytic Virotherapy. *Cancer Res.* 77, 4146–4157.

Fuertes, M.B., Kacha, A.K., Kline, J., Woo, S.-R., Kranz, D.M., Murphy, K.M., and Gajewski, T.F. (2011). Host type I IFN signals are required for antitumor CD8⁺ T cell responses through CD8 α ⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 208, 2005.

Garcin, G., Paul, F., Staufenbiel, M., Bordat, Y., Van der Heyden, J., Wilmes, S., Cartron, G., Apparailly, F., De Koker, S., Piehler, J., et al. (2014). High efficiency cell-specific targeting of cytokine activity. *Nat. Commun.* 5, 3016.

JB, S., Y, H., N, Z., KC, S., B, S., RD, S., P, H., and MJ, S. (2007). Type I IFN contributes to NK cell homeostasis, activation, and antitumor function. *J. Immunol.* 178, 7540–7549.

Kaufman, H.L., Kohlhapp, F.J., and Zloza, A. (2015). Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 642.

Kellerman, L.C., Valeyrie, L., Fernandez, N., Opolon, P., Sabourin, J.C., Maubec,

E., Le Roy, P., Kane, A., Legrand, A., Abina, M.A., et al. (2003). Regression of AK7 malignant mesothelioma established in immunocompetent mice following intratumoral gene transfer of interferon gamma. *Cancer Gene Ther.* 10, 481–490.

Kurokawa, C., Iankov, I.D., Anderson, S.K., Aderca, I., Leontovich, A.A., Maurer, M.J., Oberg, A.L., Schroeder, M.A., Giannini, C., Greiner, S.M., et al. (2018). Constitutive interferon pathway activation in tumors as an efficacy determinant following oncolytic virotherapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 110.

Lawson, N.D., Stillman, E.A., Whitt, M.A., and Rose, J.K. (1995). Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 4477–4481.

Liu, H., Golji, J., Brodeur, L.K., Chung, F.S., Chen, J.T., DeBeaumont, R.S., Bullock, C.P., Jones, M.D., Kerr, G., Li, L., et al. (2019). Tumor-derived IFN triggers chronic pathway agonism and sensitivity to ADAR loss. *Nat. Med.* 25, 95–102.

Russell, L., Peng, K.W., Russell, S.J., and Diaz, R.M. (2019). Oncolytic Viruses: Priming Time for Cancer Immunotherapy. *BioDrugs* 33, 485–501.

Schiavoni, G., Mattei, F., and Gabriele, L. (2013). Type I Interferons as Stimulators of DC-Mediated Cross-Priming: Impact on Anti-Tumor Response. *Front. Immunol.* 4.

Schlapschy, M., Binder, U., Börger, C., Theobald, I., Wachinger, K., Kisling, S., Haller, D., and Skerra, A. (2013). PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins.

Protein Eng. Des. Sel. 26, 489.

Schneider, W.M., Chevillotte, M.D., and Rice, C.M. (2014). Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 513–545.

Stojdl, D.F., Lichty, B., Knowles, S., Marius, R., Atkins, H., Sonenberg, N., and Bell, J.C. (2000). Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat. Med.* 6, 821–825.

Stojdl, D.F., Lichty, B.D., tenOever, B.R., Paterson, J.M., Power, A.T., Knowles, S., Marius, R., Reynard, J., Poliquin, L., Atkins, H., et al. (2003). VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* 4, 263–275.

Tovey, M.G., Begon-Lours, J., and Gresser, I. (1974). A Method for the Large Scale Production of Potent Interferon Preparations (38196). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 146, 809–815.

Trottier, M.D., Palian, B.M., and Shoshkes Reiss, C. (2005). VSV replication in neurons is inhibited by type I IFN at multiple stages of infection. *Virology* 333, 215–225.

Westcott, M.M., Liu, J., Rajani, K., D'Agostino, R., Lyles, D.S., and Porosnicu, M. (2015). Interferon Beta and Interferon Alpha 2a Differentially Protect Head and Neck Cancer Cells from Vesicular Stomatitis Virus-Induced Oncolysis. *J. Virol.* 89, 7944–7954.

Figure legends

Figure 1: mCD20-targeted IFNAR1 antagonist is able to block IFNAR1 signaling in B

cells in vitro. A) In order to specifically target the IFNAR signaling on different types of cells, the first step was to obtain a library of anti-IFNAR1 VHHs through the immunization of lamas and subsequent phage display screening of the obtained antibodies library. From this library of anti-IFNAR1 VHHs, four low affinity neutralizing candidates were chosen and fused with a high affinity VHH targeting either human or murine CD20. B) Mouse splenocytes isolated from Balb/c mice were exposed *in vitro* to IFN α -11 alone or to IFN α -11 in combination with the candidate-3 mCD20-targeted IFNAR1 antagonist during 30 minutes. The induction of pSTAT1 was measured by flow cytometry. C) Mouse splenocytes were exposed *in vitro* to IFN- α 11 alone or to IFN α -11 in combination with increasing concentrations of the four mCD20-targeted IFNAR1 antagonist candidates during 30 minutes. The induction of pSTAT1 was measured by flow cytometry. The % of pSTAT1 neutralization was calculated as following: $((\text{PStat1 MFI of cells treated with IFN}\alpha 11 - \text{PStat1 MFI of cells treated with IFN}\alpha 11 \text{ and the antagonist}) / (\text{PStat1 MFI of cells treated with IFN}\alpha 11 - \text{PStat1 MFI of untreated cells})) \times 100$. MFI represents the mean of fluorescence. D) The targeting potential of the four candidates fused with the nanobody against mCD20 was calculated as the ratio of the IC50 between non-targeted (CD19- CD20-) and targeted (CD19+ CD20+) splenocytes.

Figure 2: the mCD20-targeted IFNAR1 antagonist is able to block IFNAR1 signaling in B cells in vivo: A) Time line of the experiment. B) C57BL/6 mice received PBS, 30000 U of a natural mix of type I or a natural mix of IFN I and 10 µg of the mCD20-targeted IFNAR1 antagonist. After 17h, splenocytes were isolated and their CD19 and ISG54 expression was analyzed by flow cytometry. C) Neutralization % of ISG expression was calculated by dividing the difference of MFI between the IFN I control and the antagonist-treated samples, to the difference of MFIs between the IFN I and PBS controls. Results were represented as means ± SEM of four different experiments.

Figure 3: the hCD20-targeted IFNAR1 antagonist blocks IFNAR signaling only on hCD20 expressing B16 melanoma cells and AK7 mesothelioma cells. A) hCD20- or hCD20+ B16 or AK7 cancer cell lines were treated either with a panel of doses of hCD20-targeted IFNAR antagonist and IFN-α11 (3000 U/ml), with IFN-α11 (3000 U/ml) alone or left untreated. Antagonist was added 30 minutes before IFN-α11. 24h later, ISG54 expression was measured by flow cytometry. B) hCD20- or hCD20+ B16 or AK7 cell lines were treated with IFN-α11 in presence of increasing doses of hCD20-targeted IFNAR antagonist. 24h later, ISG54 and PD-L1 expression was measured by flow cytometry. Neutralization % was calculated by dividing the difference of MFIs between the IFN I-treated and the IFN I/antagonist-treated samples, to the difference of MFIs between the IFN I-treated samples and PBS-treated controls, and multiplying by 100. Results were represented as means + SEM of three different independent experiments.

Figure 4: the hCD20-targeted IFNAR antagonist is able to neutralize the antiviral properties of IFNAR signaling on hCD20 expressing tumor cells lines. A) After treatment with different doses of hCD20-targeted IFNAR antagonist, B16 tumor cells were exposed to 100 U/ml IFN- α 11 alone or to 100 U/ml IFN- α 11 and VSV (I+V) (MOI=0.12). Cells were stained and fixed with a violet crystal solution. B) After exposition to hCD20-targeted IFNAR1 antagonist, 100 U/ml of IFN- α 11 and/or VSV at a MOI of 0.12, live cells identified by violet crystal staining were quantified 48h hours later. Live cells % was calculated by dividing the difference of absorbance at 570 nm between the IFN I-treated and the IFN I/antagonist-treated samples, to the difference of absorbance at 570 nm absorbance between the IFN I-treated and non-treated, and multiplying by 100. Results were represented as means \pm SEM of three different experiments.

Figure 5: infection by VSV triggers the IFN I response and ISG expression in AK7 tumor bearing mice. A) AK7 bearing mice were injected intravenously with 1.5×10^7 PFUs of VSV. At different time points after injection, blood was collected and IFN- α measured by ELISA. Results are the means \pm SEM of three independent experiments. B) AK7 bearing mice were injected with 1.5×10^7 PFUs of VSV. At different time points after injection, tumors and spleens were collected from 4 mice to measure ISG54 expression by western blot in each of them.

Figure 6: the hCD20-targeted IFNAR antagonist reduces in vivo the expression of ISG and increases VSV replication in hCD20 expressing tumor cells in vivo. hCD20+ AK7 tumor bearing mice were injected IV with 1.5×10^7 PFUs of VSV alone or simultaneously with 10 μg of the hCD20-targeted IFNAR1 antagonist (Anta) by intraperitoneal injection followed by a second dose of 10 μg of the antagonist 12 h later. Tumors and spleens were retrieved 24h later. A) The expression of ISG54 was measured in CD45- and CD45+ cells from dissociated tumors by flow cytometry. B) VSV-G and VSV-N expression were measured by (RT)qPCR. ΔCt represents the difference of cycle numbers between the target gene and the endogenous control gene *Rplp0*. Results are the mean \pm SEM of three independent experiments.

Figure 7: the combination of VSV and the hCD20 targeted IFNAR antagonist slightly increases survival of hCD20 expressing AK7 tumor-bearing mice. A) Timeline of the experiment. B) C57BL/6 mice bearing AK7 hCD20 tumors were injected intravenously with 1.5×10^6 PFUs of VSV and when indicated intraperitoneally with 10 μg of the hCD20/mIFNAR1 antagonist 12h apart for two days (4 injections in total). Mice survival was then monitored (n=mice per group).

Figure 1

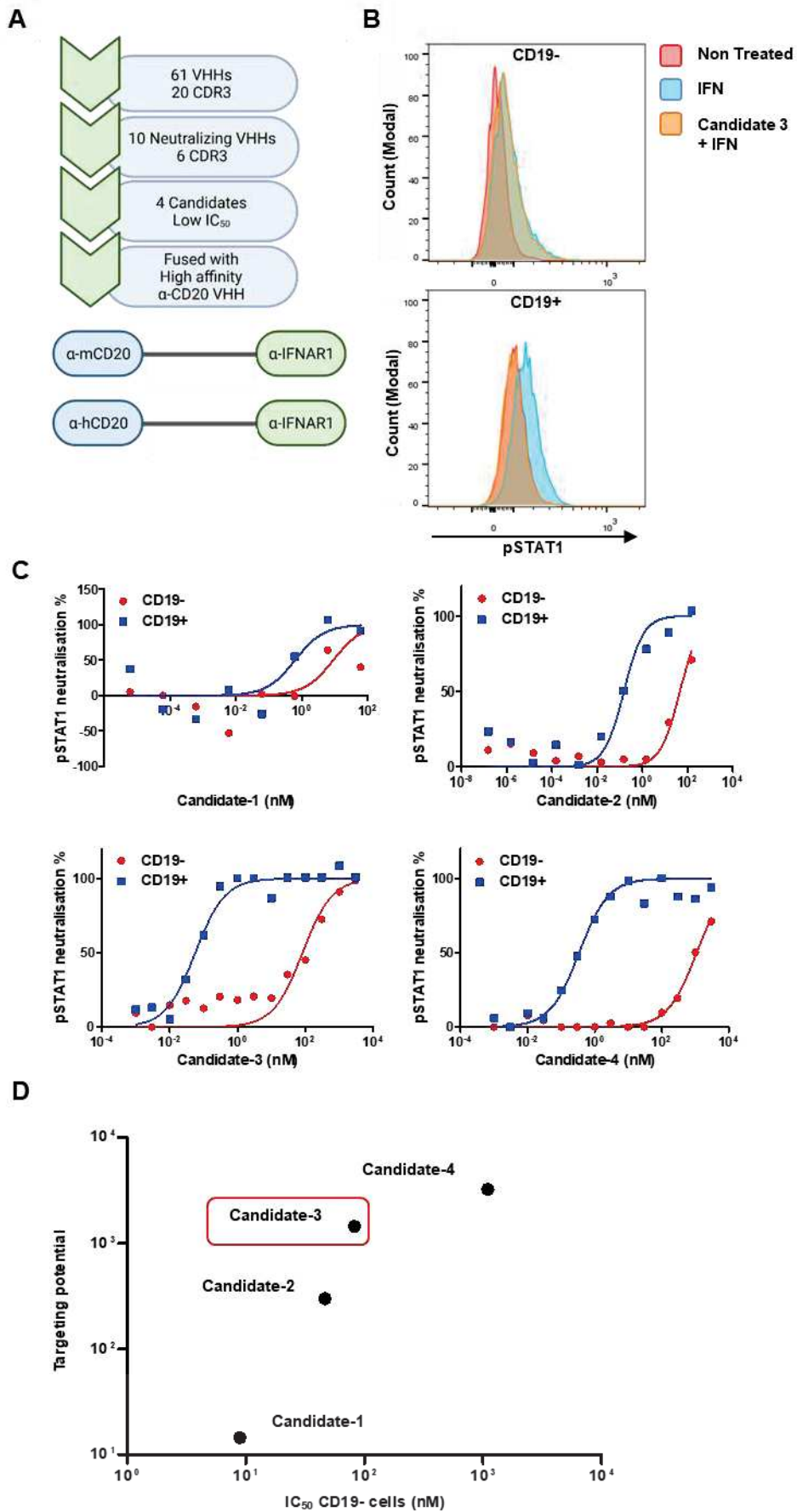


Figure 2

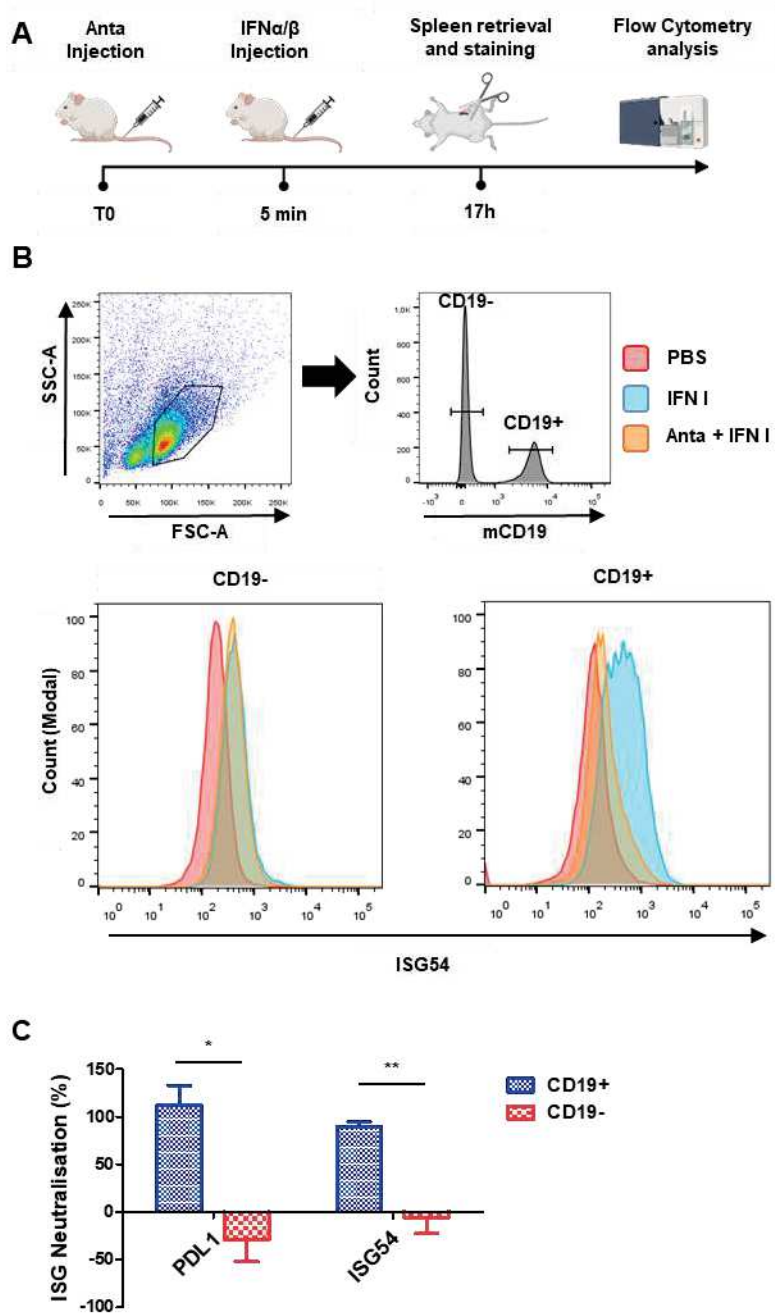


Figure 3

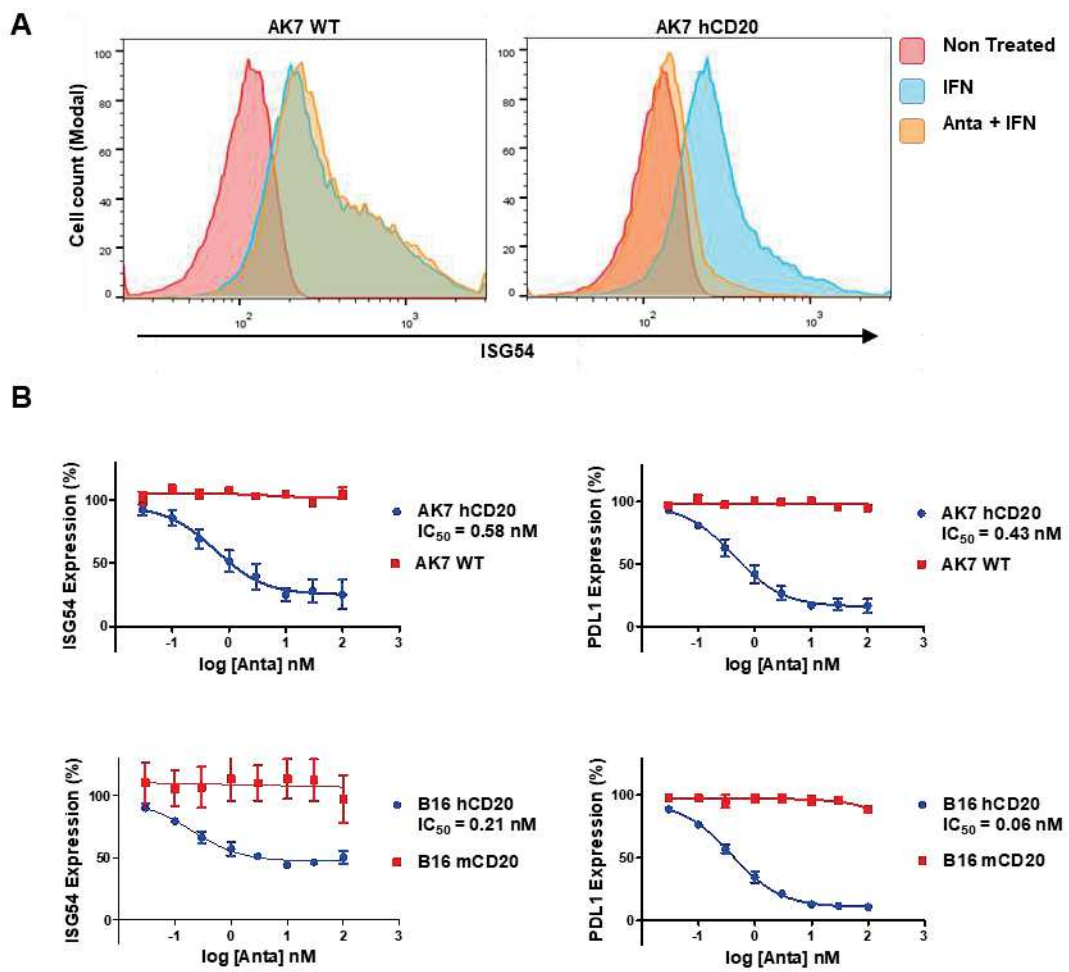


Figure 4

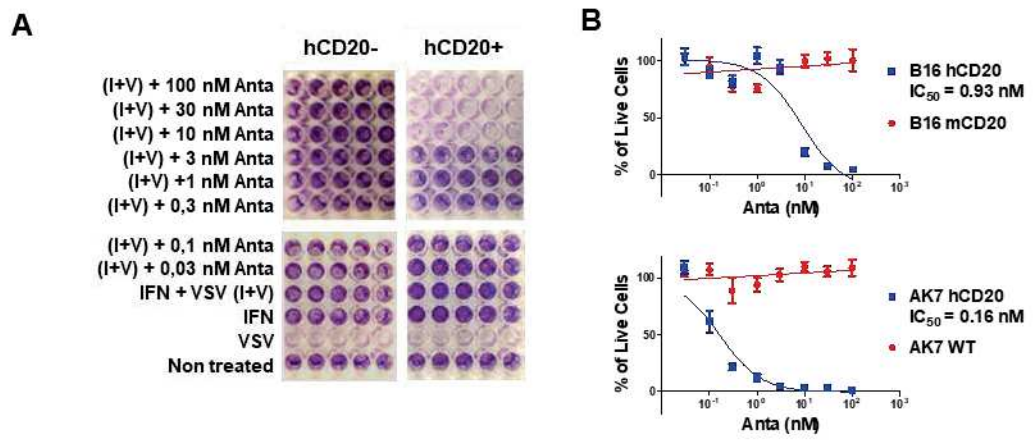


Figure 5

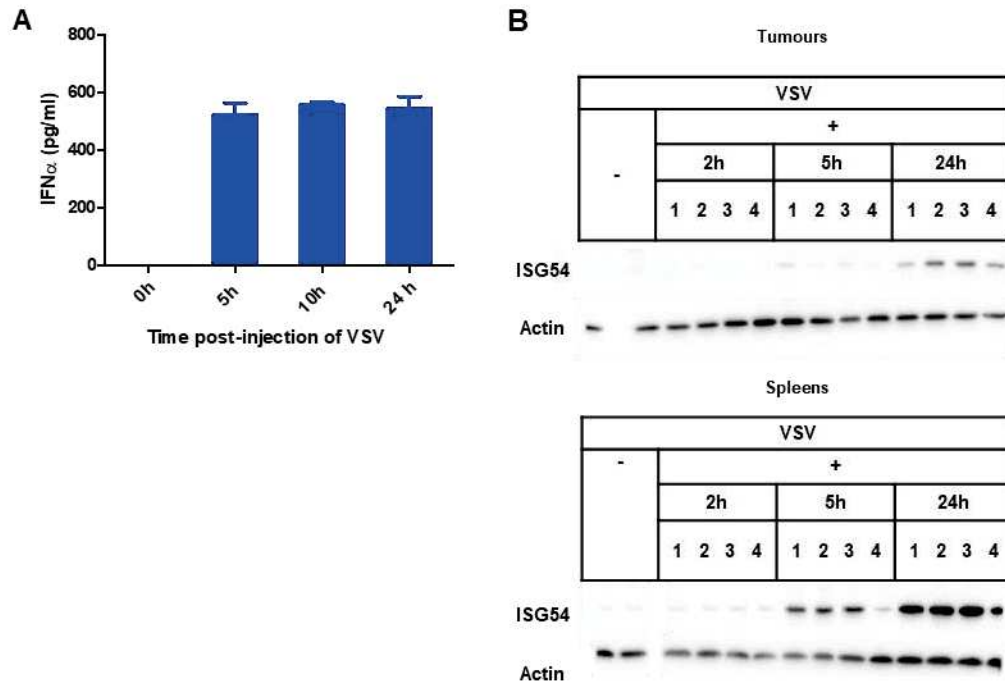


Figure 6

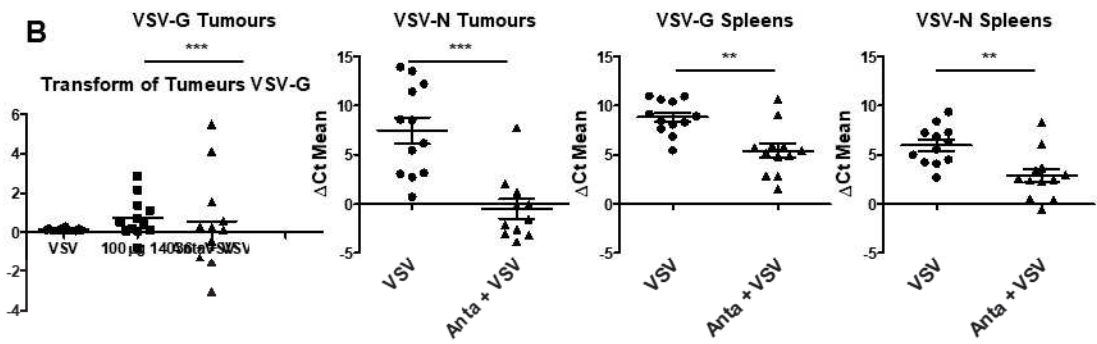
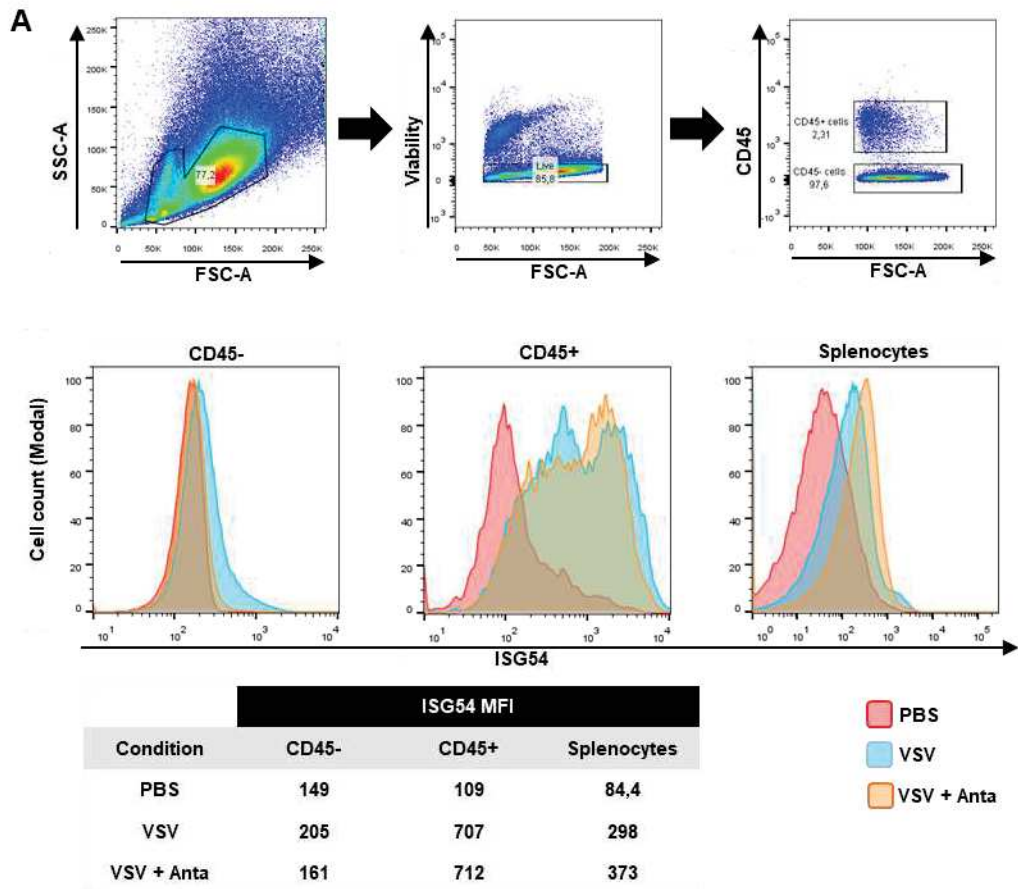
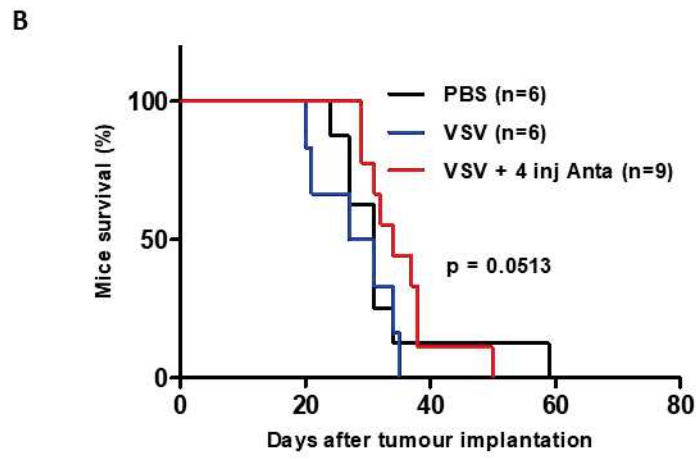
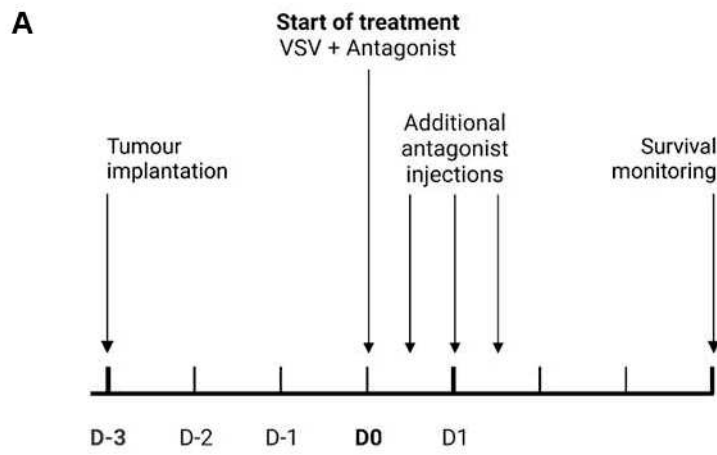
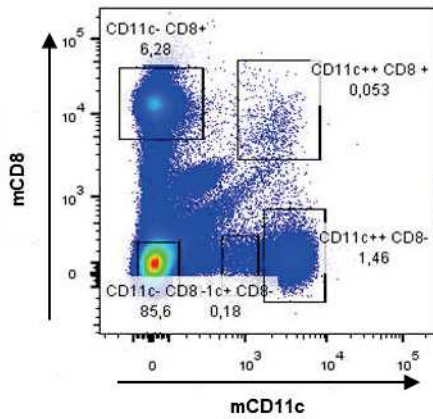


Figure 7

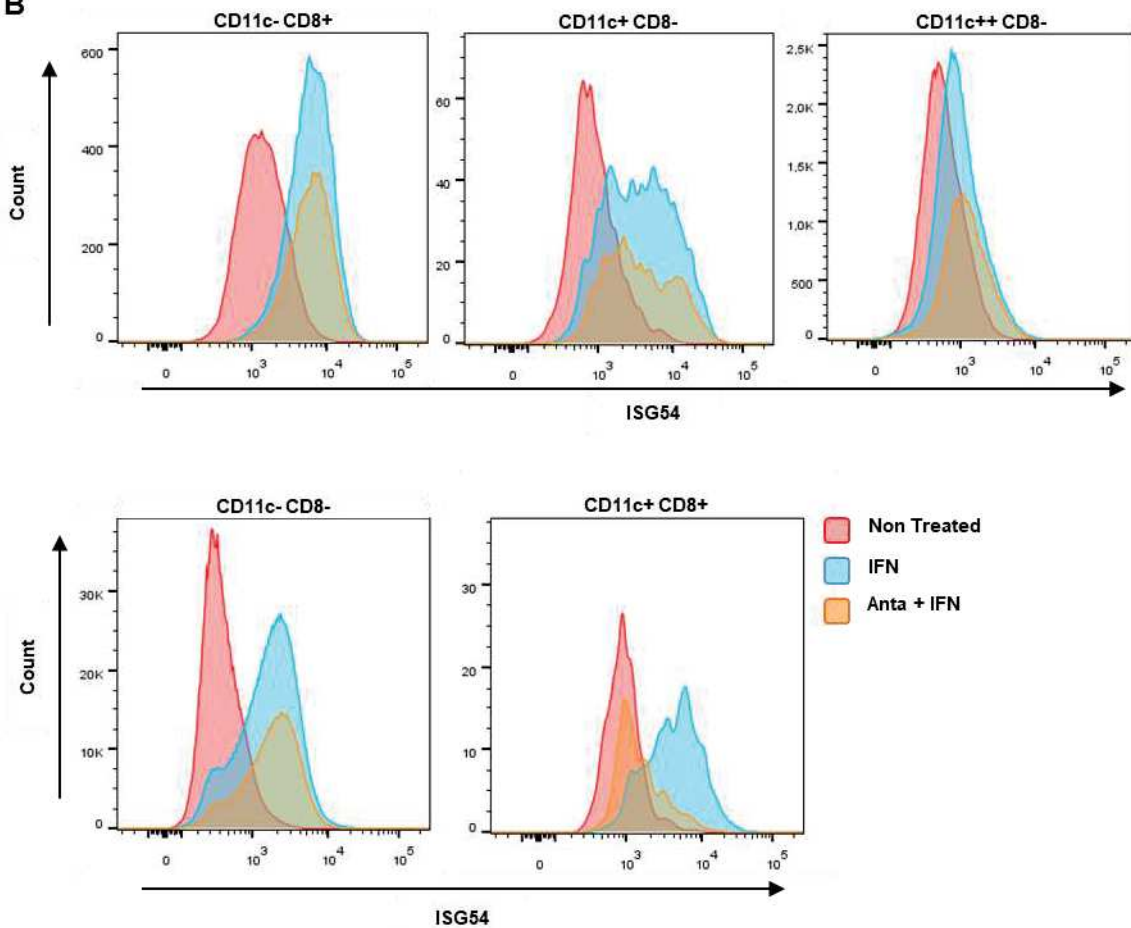


Supplemental data 1

A

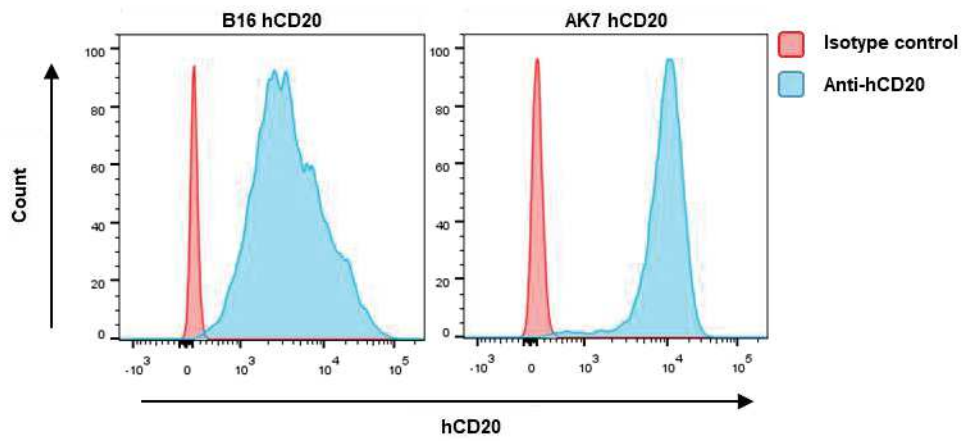


B



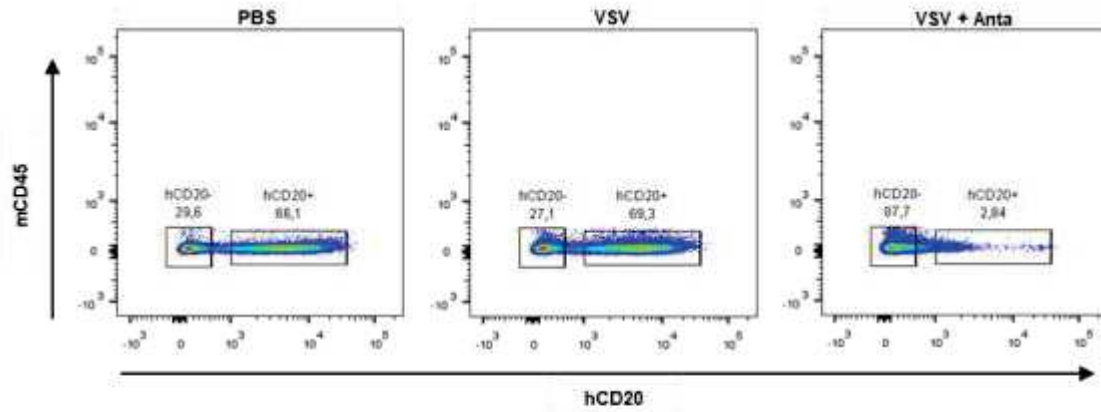
Supplemental data 1: The use of an IFNAR1 antagonist targeted towards CLEC9A-expressing cells can neutralize IFN-induced ISG54 expression. DBA/2 mice were injected intravenously with either PBS, 30000 U of a natural mix of type I IFN or 30 µg of the targeted antagonist followed by a natural mix of type I IFN 5 minutes later. Spleens were recovered 24h later and the expression of ISG54 was analysed by flow cytometry on several splenocytes populations, among them, the CLEC9A+ splenocytes co-expressing CD11c and CD8.

Supplemental data 2



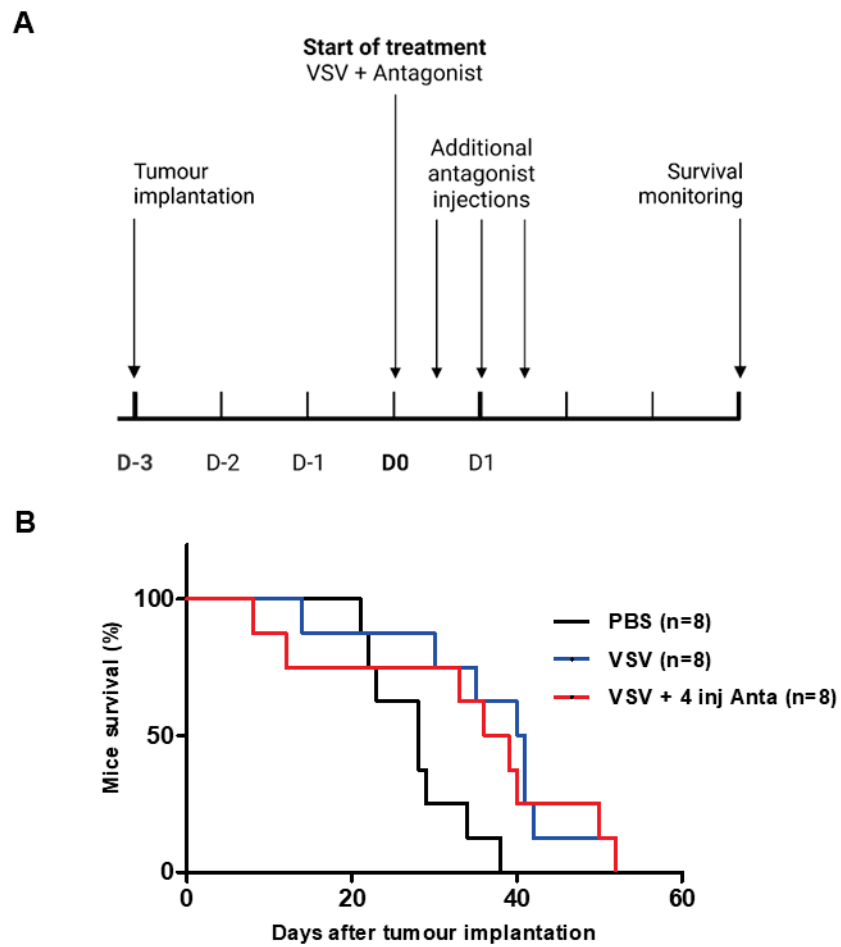
Supplemental data 2: The expression of hCD20 on the hCD20 B16 and hCD20 AK7 cell lines in this project. In vitro cultured cells were stained with an anti-hCD20 APC-H7 labelled antibody and the fluorescence emission was then analysed by flow cytometry.

Supplemental data 3



Supplemental data 3: The expression of hCD20 in hCD20 AK7 tumours can no longer be detected after injection with the IFNAR1 antagonist targeted towards hCD20. Tumours were implanted by intraperitoneal injection of $1.5 \cdot 10^7$ AK7 hCD20 cells and 3 days later, mice were injected with either intravenous PBS, intravenous $1.5 \cdot 10^7$ PFUs of VSV or intraperitoneal $10 \mu\text{g}$ of targeted IFNAR1 antagonist along with intravenous $1.5 \cdot 10^7$ PFUs of VSV. Tumour were then dissociated by mechanical and enzymatic procedures and the expression of hCD20 and mCD45 were quantified by flow cytometry using anti-hCD20 APC-H7 labelled and anti-mCD45 PE-labelled antibodies.

Supplemental data 4



Supplemental data 4: The use of $1.5 \cdot 10^7$ PFUs of VSV in combination with the targeted IFNAR1 antagonist cause early mice deaths due to neurotoxic side effects. A) Mice were implanted with $1.5 \cdot 10^7$ AK7 hCD20 cells by intraperitoneal injection in C57/bl6 female mice. 3 days later, mice were injected with either intravenous PBS, intravenous $1.5 \cdot 10^7$ PFUs of VSV or intraperitoneal 10 μ g of targeted IFNAR1 antagonist along with intravenous $1.5 \cdot 10^7$ PFUs of VSV. Additional targeted IFNAR1 antagonist was injected each 12h for a total of 4 injections. B) The survival of the mice was observed (n=number of mice).

7 Résultats Complémentaires.

Dans cette section, je présente quelques résultats complémentaires aux résultats présentés dans l'article précédent. Tout d'abord, je présente des travaux de mise au point de la stratégie de neutralisation spécifique d'IFNAR, ainsi que de test de la sensibilité des cellules AK7 hCD20 aux IFN de type III. Ensuite, je montre quelques expériences sur la caractérisation et la mise au point du modèle expérimentale AK7 hCD20 utilisé dans nos expériences *in vivo*, notamment la stabilité de l'expression du hCD20. Enfin, je présente les résultats obtenus avec la lignée AK7 IFNAR1KO, utilisée dans des expériences *in vitro* et *in vivo* dans le but de valider la neutralisation de la signalisation d'IFNAR permettant à la thérapie virale antitumorale d'être efficace.

7.1 L'antagoniste ciblée ne neutralise pas IFNAR en « trans »

La stratégie de neutralisation ciblée utilisée dans ce projet est caractérisée par la fixation de l'antagoniste à une population cellulaire spécifique par le biais d'un marqueur de surface déterminé permettant la neutralisation de son IFNAR. Dans un contexte *in vivo*, nos cellules tumorales AK7 hCD20 peuvent être en contact étroit avec d'autres cellules du stroma tumoral, ce qui pourrait permettre au fragment anti-mIFNAR1 de l'antagoniste de se fixer en « trans » sur des cellules n'exprimant pas hCD20. De plus, ceci peut nous être utile pour vérifier si le nanobody qui cible le CD20 humain ne pourrait pas reconnaître aussi le CD20 murin.

Afin de répondre à ces questions, nous avons mis en co-culture des cellules B16 hCD20 et des cellules B16 mCD20. Ensuite, les cellules ont été traitées avec l'antagoniste ciblé hCD20 suivi de l'IFN- α 11. Par cytométrie de flux nous avons pu observer la neutralisation de l'expression de PD-L1 seulement dans les populations de B16 hCD20. Les résultats obtenus démontrent une absence de neutralisation en « trans » et une absence de reconnaissance du mCD20, puisque seules les cellules B16 hCD20 exhibaient une neutralisation de PD-L1 dans la co-culture (Figure 29). L'antagoniste ciblé sur le hCD20 ne reconnaît donc pas le mCD20 et n'agit pas en trans sur les cellules adjacentes aux cellules hCD20+.

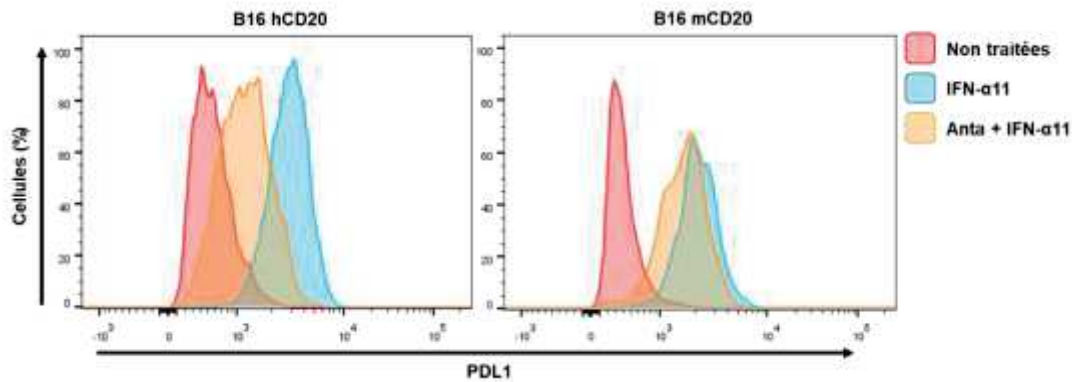


Figure 29 L'antagoniste ciblée ne permet de neutraliser en « trans » le IFNAR des cellules adjacentes aux cellules ciblées. Des cellules B16 exprimant le CD20 humain et des cellules B16 exprimant le CD20 murin ont été mises en co-culture. Ensuite, elles ont été traitées avec 1,7 nM d'antagoniste ciblée suivi par 300 U/ml d'IFN- α 11. L'expression de PDL1 a été ensuite mesurée par cytométrie de flux, différenciant les populations de B16 par un marquage de hCD20 à travers un anticorps anti-hCD20.

7.2 Stabilité de l'activité de neutralisation *in vivo* d'antagonistes ayant un linker PASylée

Du fait de la petite taille de notre antagoniste ciblé, en comparaison à un anticorps conventionnel, l'utilisation d'un linker PASylée permet une meilleure stabilité *in vivo* grâce à l'augmentation du volume apparent de la molécule. Afin de déterminer la durée de la neutralisation par nos antagonistes, l'antagoniste mCD20/ α -mIFNAR1 fut injecté dans des souris C57BL/6, suivi d'une injection d'IFN de type I à différents temps.

L'antagoniste ciblé est capable de neutraliser l'expression ISG54, induite par l'administration d'IFN de type I, au moins 5h après injection. Cette neutralisation commence à diminuer à partir de 24h post-injection pour disparaître totalement à 40h post-injection de l'antagoniste (Figure 30). Ceci nous donne une idée de la stabilité que ce genre de molécules recombinantes exhibe dans des conditions *in vivo*, soulignant le besoin d'administrer une deuxième dose d'antagoniste avant 24h si nous voulons maintenir cette neutralisation de la signalisation d'IFNAR tout au long du traitement avec le VSV dans notre modèle AK7 hCD20.

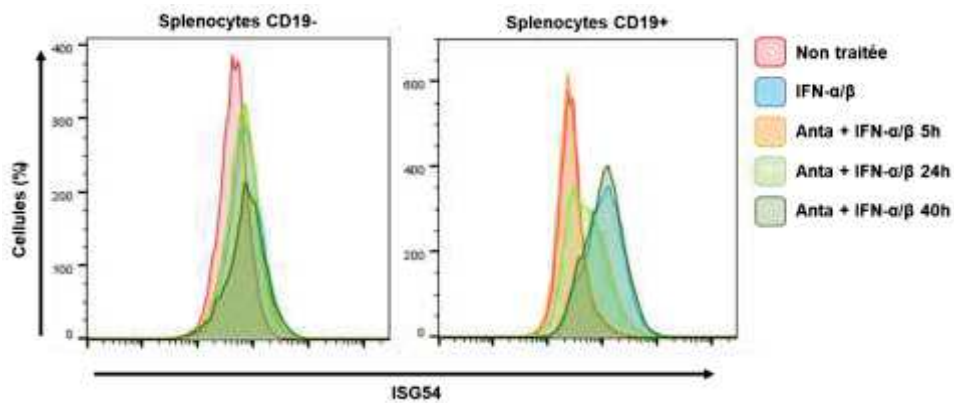


Figure 30 Stabilité de la neutralisation d'IFNAR par des antagonistes ciblés *in vivo*. Par voie intraveineuse 30 μ g d'antagoniste ciblé mCD20 fût injecté. Ensuite, 30000 U d'IFN- α/β ont été administrées par voie intraveineuse 5h, 24h ou 40h après l'administration de l'antagoniste. L'expression d'ISG54 fût analysée par cytométrie de flux.

7.3 Persistance de l'expression de hCD20 dans la lignée AK7 hCD20 *in vivo*

L'expression du CD20 humain à la surface des cellules AK7 est un élément clé dans notre stratégie thérapeutique *in vivo*. Il est indispensable que l'expression d'hCD20 soit suffisamment stable pendant la durée du traitement avec l'antagoniste ciblé hCD20/ α -mIFNAR1.

Pour vérifier cela, des cellules AK7 hCD20 furent implantées dans la cavité péritonéale des souris et 21 jours après, les tumeurs furent prélevées et l'expression de hCD20 vérifiée en cytométrie de flux. L'expression de hCD20 avait totalement disparu 21 jours après implantation dans la souris (Figure 31A). Afin de mieux caractériser la perte d'expression de hCD20, des nouvelles tumeurs AK7 hCD20 furent implantées dans la souris et prélevées à différents jours, en analysant l'expression de hCD20.

Dès 11 jours, l'expression de hCD20 était réduite de plus de la moitié, disparaissant totalement à partir de 18 jours (Figure 31B). Après dissociation et remise en culture *in vitro* des tumeurs AK7 hCD20 dans du milieu de culture RPMI contenant l'antibiotique de sélection G418, l'expression revenait 7 jours après (Figure 31C).

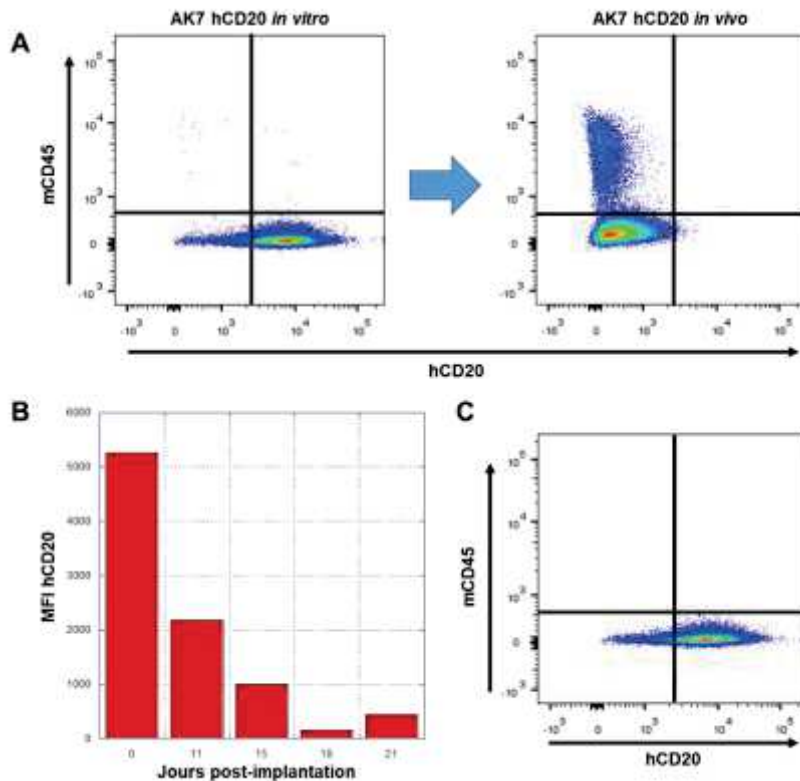


Figure 31 Stabilité de l'expression hCD20 dans note modèle *in vivo* d'AK7 hCD20. A) L'expression de hCD20 et mCD45 fut analysée par cytométrie de flux sur des cellules AK7 hCD20 cultivés *in vitro*, et sur des tumeurs AK7 hCD20 21 jours post-implantation intrapéritonéale. B) Caractérisation par cytométrie de flux de la perte d'expression de hCD20 des tumeurs AK7 hCD20 à différents jours post-implantation. C) L'expression de hCD20 et mCD45 mesurée par cytométrie de flux sur des cellules d'une tumeur AK7 hCD20 de 21 jours, dissociée et remise en culture avec de l'antibiotique de sélection G418.

7.4 Obtention d'une lignée d'AK7 hCD20 stable

Suite à la perte d'expression de hCD20 *in vivo* des tumeurs AK7 hCD20, il fut nécessaire d'isoler un clone AK7 hCD20 capable d'exprimer hCD20 de manière suffisamment stable pendant la durée du traitement avec notre antagoniste. Un nouveau clone d'AK7 hCD20 fut sélectionné, exprimant fortement hCD20 dans des conditions *in vitro* avec ou sans l'antibiotique de sélection G418 (Figure 32A). Ce nouveau clone AK7 hCD20 fut implanté dans des souris, et après 16 jours post-implantation, la tumeur fut dissociée et remise en culture *in vitro* avec du milieu RPMI sans G418, l'expression d'hCD20 analysée après plusieurs jours en culture (Figure 32B). Ensuite, la population hCD20 positive de la condition sans G418 fut triée par cytométrie de flux et sous-clonée par la suite.

Après avoir sélectionné un clone AK7 hCD20 exprimant le hCD20 de manière stable sans antibiotique de sélection, ce clone fut implanté par injection intrapéritonéale dans des souris. Les tumeurs furent extraites à 11 et 18 jours, et l'expression de hCD20 fut ensuite analysée. L'expression de hCD20 est stable jusqu'à 11 jours puis elle est partiellement perdue après 18 jours (Figure 32C).

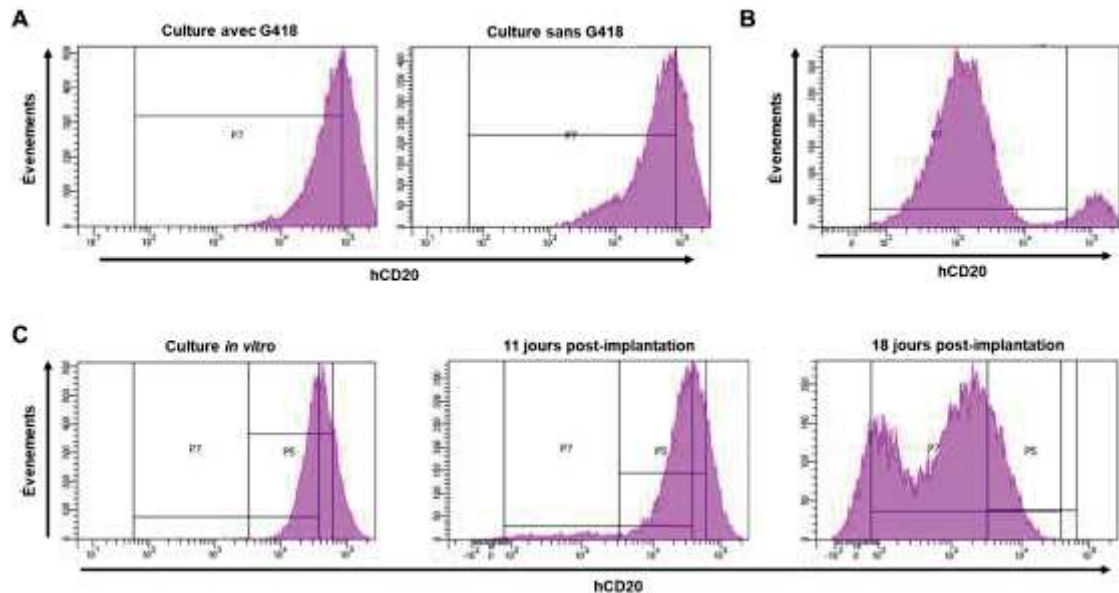


Figure 32 Obtention d'une lignée AK7 exprimant hCD20 de manière stable. A) Expression d'hCD20 sur le nouveau clone AK7 hCD20 cultivé avec ou sans l'antibiotique de sélection G418, analysée par cytométrie de flux. B) Expression d'hCD20 de la tumeur AK7 hCD20 dissociée et remise en culture sans l'antibiotique de sélection G418, analysée par cytométrie de flux. C) Stabilité de l'expression du sous-clone AK7 hCD20 dans des conditions in vitro sans antibiotique de sélection G418 ou dans des conditions in vivo dans des souris C57BL/6, analysée par cytométrie de flux.

7.5 La lignée AK7 hCD20 n'est pas sensible à l'IFN-λ

Les IFN de type III étant capables eux aussi de déclencher l'expression d'ISG conduisant à un état antiviral dans la cellule, nous voulions vérifier si la lignée tumorale AK7 hCD20, utilisée dans nos expériences *in vivo*, était sensible aux IFN de type III. Pour cela, les cellules AK7 hCD20 furent exposées à un IFN de type III, l'IFN-λ2, ou un IFN de type I, l'IFN-α11. Suite à la stimulation par un de ces types d'IFN, nous avons pu observer l'expression de PD-L1 uniquement dans les cellules traitées par l'IFN-α11, alors que cette expression est totalement absente dans les cellules exposées à l'IFN-λ2 (Figure 33).

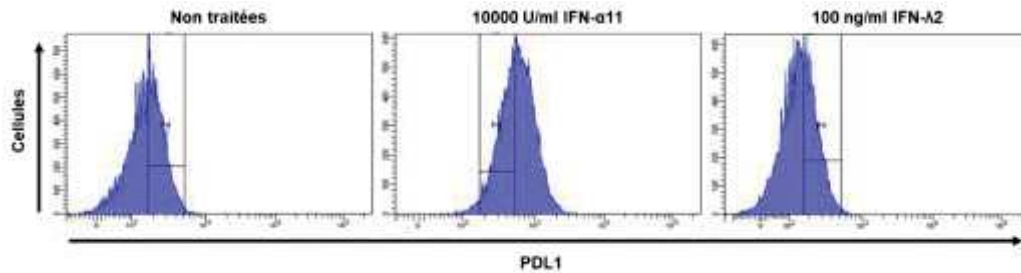


Figure 33 Sensibilité des cellules AK7 hCD20 à des IFN de type I ou de type III. Suite à la stimulation par 10000 U/ml d'IFN- α 11 ou 100 ng/ml d'IFN- λ 2 l'expression de PDL1 est mesurée par cytométrie de flux.

7.6 Etude in vivo de la sensibilité au VSV des cellules AK7 n'exprimant pas IFNAR

Afin d'étudier l'impact de la neutralisation de la signalisation IFNAR dans le contexte de l'oncolyse virale, nous avons mis en place un modèle de mésothéliome AK7 IFNAR1ko. L'utilisation du modèle AK7 IFNAR1ko a pour but de mimer ce que la neutralisation d'IFNAR à l'aide des antagonistes ciblés peut accomplir. Ce modèle permet donc de déterminer in vitro et in vivo si l'inactivation de la signalisation IFNAR permet de sensibiliser les cellules tumorales AK7 à l'activité oncolytique du VSV. Elle permet ensuite d'étudier le nombre d'administrations du VSV, l'immunisation acquise suite à l'oncolyse virale ainsi que son évolution au fil du temps afin de déterminer le meilleur régime de traitement avec les antagonistes ciblés.

7.6.1 Génération de lignées AK7 IFNAR1_{ko}

Tout d'abord, j'ai modifié la lignée de mésothéliome AK7 en inactivant les deux copies du gène *ifnar1* grâce à la technique d'édition CRISPR/Cas9. Les cellules AK7 ont été infectées avec des vecteurs lentiviraux codant pour la nucléase Cas9 et un ARNg ciblant la région du peptide signal d'*ifnar1* situé entre les paires de bases 91.286.607 et 91.286.626 du chromosome 16. Suite à la sélection par antibiotique et au clonage par dilution limite, nous avons obtenu une lignée AK7 IFNAR1_{ko} n'exprimant plus IFNAR1 (Figure 34A). Après séquençage, nous avons pu confirmer la délétion d'environ 20 nucléotides dans la région ciblée par le ARNg (Figure 34B). Ces cellules AK7 IFNAR1_{ko} ne présentaient plus de sensibilité pour les IFN de type I, car elles sont incapables d'exprimer des ISG (PD-L1 et ISG54) après exposition à de l'IFN- α 11 (Figure 34C). De plus, elles devenaient sensibles à l'action oncolytique du VSV in vitro, même pré-traitées avec

de l'IFN- α 11, ce qui n'est pas le cas des cellules AK7 non modifiées (données non montrées).

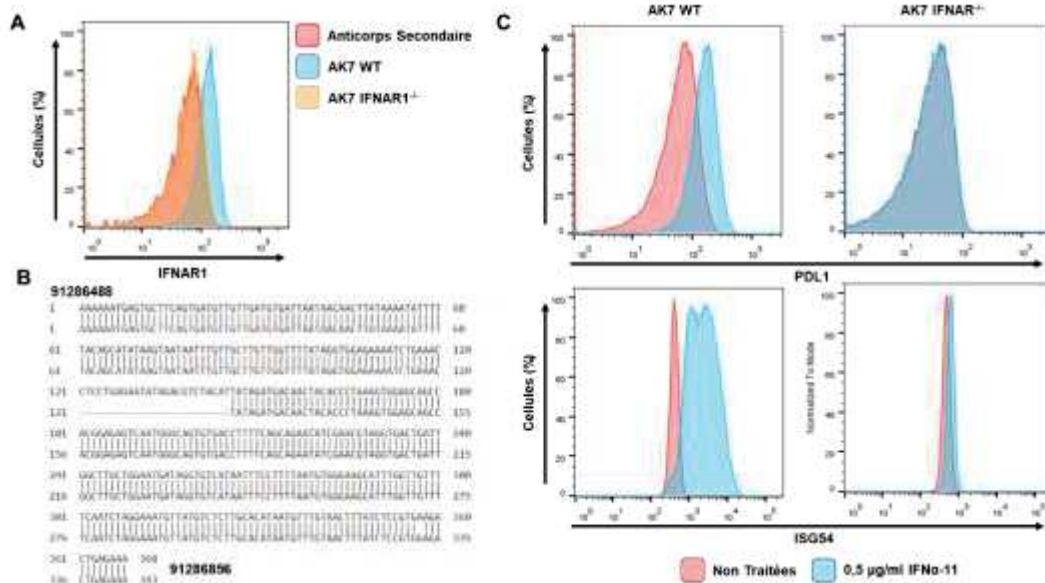


Figure 34 Caractérisation de la lignée AK7 IFNAR1_{KO}. A) Analyse de l'expression d'IFNAR1 par cytométrie de flux. B) Séquençage de la région d'ifnar1 ciblée par le ARNg et cas9. C) Induction des ISG PDL1 et ISG54 après stimulation avec de l'IFN- α 11 dans des lignées AK7 WT et AK7 IFNAR1_{KO}.

7.6.2 Effet thérapeutique du VSV dans des tumeurs AK7 IFNAR1_{KO} in vivo

Suite à l'obtention de la lignée AK7 IFNAR1_{KO}, nous avons voulu tester l'efficacité du VSV contre ces tumeurs in vivo. Après avoir implanté par voie intrapéritonéale des cellules AK7 IFNAR1_{KO} dans des souris C57BL/6, du VSV a été injecté par voie intraveineuse. On observe qu'à la différence des lignées AK7 WT et AK7 hCD20, où les souris injectées avec du PBS survivaient jusqu'à 20-30 jours post-implantation tumorale, les souris portant des tumeurs AK IFNAR1_{KO} repoussaient ce délai jusqu'à 50 jours, ce qui semble indiquer une plus faible vitesse de croissance de la part des tumeurs AK7 IFNAR1_{KO}. L'administration intraveineuse d'une ou de trois doses de VSV a un effet thérapeutique important car elle permet la survie à long terme de presque la totalité des souris portant des tumeurs AK7 IFNAR1_{KO} (Figure 35A). L'effet thérapeutique du VSV est plus modeste chez les souris porteuses de tumeurs AK7 hCD20, repoussant leur mort seulement de quelques jours. Ce résultat indique une forte sensibilité des tumeurs AK7 IFNAR1_{KO} in vivo, ce qui conforte notre approche d'inhibition de l'IFNAR tumoral.

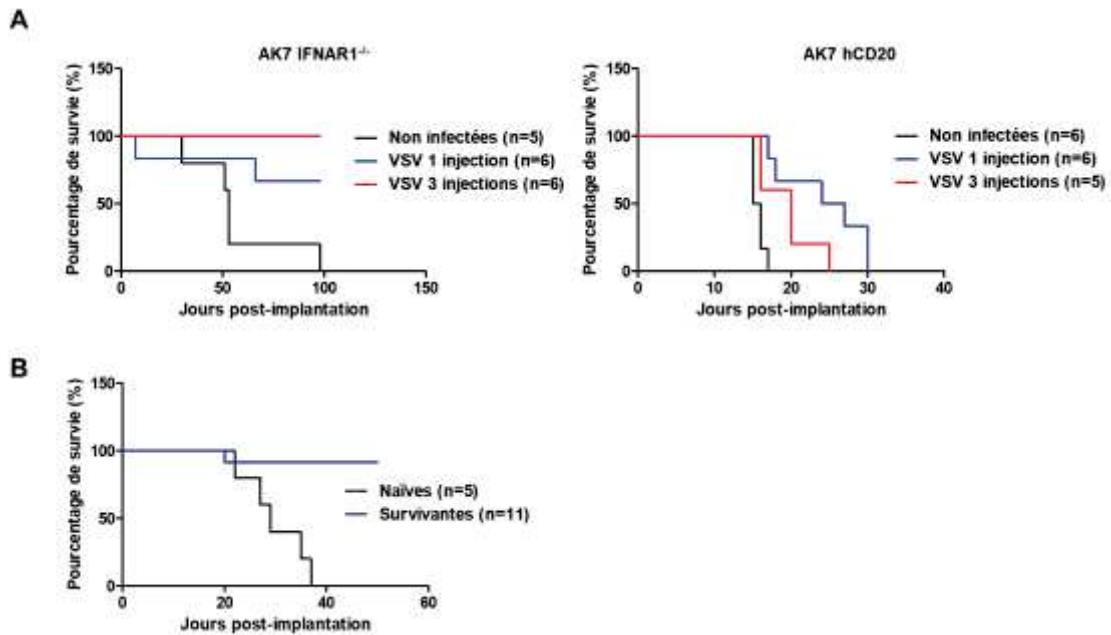


Figure 35 Effet thérapeutique du VSV dans un modèle tumoral AK7 IFNAR1_{KO}. A) Impact de l'injection de VSV dans des modèles tumoraux de AK7 hCD20 et AK7 IFNAR1_{KO}. B) Immunisation des souris survivantes de l'expérience précédente, contre des tumeurs AK7 WT.

Afin de vérifier un potentiel effet d'immunisation tumorale suite à la survie des souris C57BL/6 porteuses de tumeur IFNAR1_{KO} ayant survécu après l'administration du VSV, j'ai implanté à nouveau les souris survivantes, ainsi que des souris C57BL/6 naïves avec des tumeurs AK7 WT. A la différence des souris naïves qui meurent toutes après les 20 à 35 jours habituels dans ce modèle de tumeur, toutes les souris survivantes sauf une ont rejeté la nouvelle implantation de tumeur AK7 et survivent au moins 50 jours (Figure 35B).

En conclusion, il semblerait que dans ce modèle AK7 IFNAR1_{KO}, le VSV induit une survie presque totale des souris et les immunise contre des nouvelles implantations tumorales, ce qui semble indiquer la présence d'une réponse mémoire contre des cellules de mésothéliome AK7. Cette partie de mon travail de thèse conforte la stratégie d'antagoniste ciblé d'IFNAR tumoral pour augmenter l'activité oncolytique du VSV in vivo.

8 Matériel et méthodes complémentaires.

8.1 Expression de PD-L1 dans les co-cultures de B16 mCD20 et B16 hCD20

Dans des plaques de 24 puits, $1,5 \times 10^6$ cellules B16 mCD20 et $1,5 \times 10^6$ B16 hCD20 sont ensemencées par puits, pour un total de $3 \cdot 10^6$ cellules par puits dans 2ml de milieu complet. 24h après, les cellules sont traitées avec 1,7 nM d'antagoniste ciblée pendant 30 minutes, suivi d'une stimulation avec 300 U/ml d'IFN- α 11 pendant 17h. Après la stimulation, les cellules sont détachées avec une solution de PBS-EDTA. L'expression de PD-L1 est analysée par cytométrie de flux.

8.2 Neutralisation de l'expression d'ISG54 dans des splenocytes

Des cellules Balb/c ont été injectées par voie intraveineuse avec 30 μ g d'antagoniste ciblé mCD20. Ensuite, 30000 U d'une combinaison naturelle d'IFN- α/β ont été injectées par voie intraveineuse 5h, 24h ou 40h après l'administration de l'antagoniste. 24h après l'injection d'IFN I, les rates des souris sont prélevées et dissociées mécaniquement sur un « cell strainer » de 100 μ m en rinçant avec du PBS. Les érythrocytes sont lysés avec un tampon ACT. Après rinçage avec du PBS, l'expression d'ISG54 est analysée par cytométrie de flux.

8.3 Stimulation de cellules avec un IFN de type III

Dans des plaques 6 puits, des cellules AK7 hCD20 sont ensemencées. 24h après les cellules sont ensuite traitées, avec 10000 U/ml d'IFN- α 11 ou 100 ng/ml d'IFN- λ 2. Après 24h de stimulation avec les divers IFN, les cellules sont ensuite dissociées avec de l'Accutase et l'expression de PD-L1 est mesurée par cytométrie de flux.

8.4 Obtention d'une lignée AK7 IFNAR1_{ko}

Des cellules LentiX furent transfectées par de la Lipofectamine 3000 (TermoFisher) avec un plasmide pLentiCRISPR V2 (GenScript) codant pour la Cas9 et l'ARNg spécifique de IFNAR1(ATGTAGACGTCTATATTCTC). Après la production de lentivirus codant pour la Cas9 et l'ARNg, il fut transféré sur les cellules AK7 à transformer. L'antibiotique de sélection, puromycine, fut ajouté 3 jours après. La délétion dans le gène *ifnar1* fut validée par séquençage d'une région du peptide signal d'*ifnar1* amplifiée par PCR (fw : GGGTTGTAGGCATCATAGCAGG ; rv : CTCAGTCTCCACGGAGATAAAGT).

8.5 Marquage et cytométrie de flux

Concernant le marquage membranaire, les cellules sont marquées pendant 30 minutes à 4°C avec divers anticorps : anti-PD-L1 murin PE (BD), anti-CD20 humain APC (BD), anti-IFNAR1 murin (MAR1-5A3), anti-IgG de souris Alexa Fluor 488 (TermoFisher). Pour le marquage intracellulaire, les cellules sont fixées et perméabilisées grâce à un kit de marquage intracellulaire (Invitrogen). L'expression intercellulaire d'ISG54 est détectée suite au marquage de 30 minutes à température ambiante avec un anticorps anti-ISG54 de souris non couplée, suivi par un marquage secondaire avec un anticorps anti-IgG de chèvre couplée à un Alexa Fluor 488 (TermoFisher)

8.6 Traitement des tumeurs AK7 IFNAR1_{KO} avec le VSV

Des souris C57BL/6 femelles furent injectées par voie intrapéritonéale avec 5×10^6 cellules AK7 IFNAR1_{KO} ou AK7 hCD20. Trois jours après implantation tumorale, $1,5 \times 10^7$ PFUs de VSV fut administré par voie intraveineuse (veine caudale) dans la souris. Dans certains groupes, $1,5 \times 10^7$ PFUs VSV furent injectés à nouveau à 6 et 9 jours post-implantation tumorale. La survie des souris fut observée pendant le reste de l'expérience. Elles furent sacrifiées selon les critères suivants : ascite de l'abdomen prononcé, neurotoxicité sous forme de trouble moteurs ou dégradation de l'état général de la souris.

8.7 Test d'immunisation contre un rechallenge de cellules AK7 WT

Les souris C57BL/6 survivantes de l'expérience de traitement des tumeurs AK7 IFNAR1_{KO} avec le VSV furent réutilisées pour cette expérience. Par injection intrapéritonéale, 5×10^6 cellules AK7 WT furent injectées dans les souris survivantes ainsi que dans des souris C57BL/6 naïves du même âge. La survie fut observée pendant le reste de l'expérience, sacrifiant les souris selon les critères suivants : ascite de l'abdomen prononcé et dégradation de l'état général de la souris.

9 Discussion

9.1 Naviguer entre Scylla et Charybde

Le paradigme de l'oncolyse virale est d'utiliser un agent viral capable de se répliquer uniquement dans la cellule tumorale suffisamment longtemps pour lyser assez de cellules cancéreuses, et d'induire ensuite une réponse immunitaire antitumorale. Cependant ces activités sont étroitement liées aux mécanismes immunitaires, dont la réponse IFN de type I fait partie. Les activités antivirales de ces cytokines peuvent limiter l'efficacité de l'oncolyse virale, mais elles jouent également un rôle primordial dans l'amorçage des réponses immunitaires antitumorales à travers la présentation d'antigènes et l'activation de cellules immunitaires effectrices [37,119,245,246]. Elles jouent aussi un rôle dans la protection des cellules saines. Les dysfonctionnements de cette voie rendent l'organisme sensible à divers pathogènes d'origine virale ou bactérienne [81].

Une stratégie visant à neutraliser la signalisation IFNAR spécifiquement dans les cellules tumorales, tout en permettant aux cellules saines, notamment les cellules immunitaires de répondre aux activités immunomodulatrices des IFN de type I serait donc complémentaire à l'oncolyse virale [119,247,248]. L'ingénierie des protéines recombinantes nous offre la possibilité de créer des antagonistes ciblés neutralisant IFNAR spécifiquement sur les cellules tumorales.

Dans ce projet, j'ai mis en place une stratégie de ciblage de la signalisation d'IFNAR, visant à la neutraliser spécifiquement dans les cellules tumorales grâce à l'utilisation d'antagonistes recombinants innovants. Cela nous a permis de neutraliser l'expression d'ISG dans les cellules tumorales, permettant à un virus oncolytique sensible aux actions antivirales des IFN de type I comme le VSV, de se répliquer spécifiquement dans la tumeur. Cependant, malgré cette augmentation de la réplication du VSV, ce traitement dans notre modèle expérimental ne nous permet pas pour le moment d'observer un effet thérapeutique net.

9.2 L'avantage de notre stratégie de ciblage

Une des problématiques concernant la neutralisation de la voie de signalisation IFNAR sur les cellules tumorales est l'expression ubiquitaire de ce récepteur. Dans le cadre de

l'oncolyse virale, la neutralisation systématique de cette voie, à travers des mAb comme le MAR-1 ou des inhibiteurs de kinases Janus comme le Ruxolitinib, pourrait s'avérer délétère sensibilisant les cellules saines à la réplication virale et impactant la réponse immunitaire antivirale [241,242]. De plus, l'induction de la réponse immunitaire antitumorale pourrait être perturbée, la réponse IFN de type I étant clé pour l'amorçage de cette réponse immunitaire [31,37,249]. Une approche de ciblage axé sur l'avidité peut être une solution à cette problématique. Des travaux précédents ont démontré l'efficacité de cette stratégie d'affinité dégénérée par la création d'immunocytokines contenant un IFN- α 2 avec une mutation Q124R couplé à un nanobody qui cible un type cellulaire particulier [185,243]. En effet, cette stratégie de ciblage présente de nombreux avantages envers d'autres anticorps bispécifiques.

La capacité de ciblage d'anticorps bispécifiques classiques repose sur deux fragments de haute affinité pour leurs cibles. Cela peut-être de grande utilité dans le cas de BiTEs, où une forte liaison entre les fragments de ciblage aux marqueurs de surface ciblés facilite l'interaction entre cellules tumorales et cellules immunitaires. Cependant en prenant l'exemple de notre antagoniste ciblé, où un des fragments cible IFNAR1 avec une faible affinité et l'autre le CD20 humain, le mode de fonctionnement d'un bsAb classique présentant une haute affinité causerait une fixation d'IFNAR1 indiscriminée et indépendante de l'expression du CD20, négligeant l'aspect spécifique de cette stratégie de neutralisation.

Un autre avantage est le format « dinanobody » de la construction. La petite taille des VHH est un atout pour la pénétration de la molécule dans des tissus souvent peu perméables comme le stroma tumoral [169,176]. Cependant, ceci implique aussi une augmentation de la « clearance rénale », réduisant le temps de résidence de l'antagoniste dans l'organisme pour des molécules en dessous du seuil de 50-60 kDa [250,251], nos antagonistes ciblés se trouvant à la limite de ce seuil (environ 55 kDa). Afin de solutionner ce problème, un linker PASylé a été utilisé pour conjuguer les deux nanobodies, augmentant la taille apparente (au-delà de 70 kDa) de l'antagoniste au-dessus de ce seuil, grâce au caractère hydrophile de ce type de linker [170]. Ceci permet à cette molécule de neutraliser IFNAR1 au-delà de 12h après injection tout en gardant les caractéristiques de perméabilité du format « nanobody ».

9.3 Le résultat de la combinaison VSV/antagoniste ciblé peut varier selon le statut de la réponse IFN des cellules tumorales

Dans notre modèle expérimental, la réponse IFN de type I est déclenchée suite à l'administration d'un agent viral comme le VSV, induisant l'expression d'ISG54 dès 5h post-infection dans la rate et 24h post-infection dans la tumeur. Cette réponse IFN de type I peut s'avérer délétère pour l'efficacité du virus oncolytique, neutralisant la réplication du VSV dans des cellules AK7 hCD20 dans nos expériences *in vitro*. L'utilisation d'un antagoniste ciblé permet donc de neutraliser ces défenses antivirales et de permettre au VSV de se répliquer dans les cellules AK7 hCD20.

Comme évoqué lors de l'introduction, certaines tumeurs peuvent présenter des altérations de la voie IFN. Ces altérations peuvent se manifester en forme d'activation constitutive ou de défauts de la voie IFN, au stade de la production d'IFN de type I ou dans la signalisation d'IFNAR. L'efficacité d'une stratégie de neutralisation de l'IFNAR tumoral est donc soumise à ces altérations tumeurs dépendantes.

Lors de la transformation maligne, la voie IFN peut être déclenchée dans la tumeur suite à la détection de signaux de danger, provoquant la libération d'IFN de type I. Pour ce type de patients, avec une réponse IFN de type I activée dans les tumeurs, l'efficacité de l'oncolyse virale peut être diminuée [212]. La notion de temps devient donc vitale dans notre stratégie d'antagonisme de l'IFNAR tumoral. Combien de temps à l'avance l'IFNAR tumoral doit-il être neutralisé avant l'administration du virus oncolytique afin que les ISG ne soient plus exprimés ?

Par exemple, dans nos expériences *in vivo* de survie, le VSV et l'antagoniste ciblé étaient injectés en même temps. Si la réponse IFN était déjà activée au moment d'administrer l'antagoniste, l'efficacité du VSV serait impactée par l'expression d'ISG antiviraux dans la cellule tumorale. Dans des expériences préliminaires nous avons observé l'expression d'ISG54 dans des tumeurs AK7 hCD20, 10 jours post-implantation. Cette expression d'ISG54 n'a pas été observée dans des tumeurs AK7 hCD20 précoces de 3-4 jours post-implantation, raison pour laquelle nous injectons notre combinaison de VSV et antagoniste à 3 jours post-implantation. Certains de ces ISG ont une expression précoce, comme ISG54, PD-L1 et les protéines Mx. Leur cinétique d'expression suite à la

stimulation par des IFN de type I est caractérisée par leur détection dès 4h post-stimulation, et une diminution prononcée au-delà des 24h [252]. D'autres ISG antiviraux peuvent être exprimés au-delà des 24 h, limitant la réplication virale. Dans une de nos expériences de survie, l'antagoniste ciblé fut injecté 12h avant le VSV, n'ayant pas d'effet sur la survie des souris portant des tumeurs AK7 hCD20. Etant donné la pléthore d'ISG exprimés suite à l'activation d'IFNAR, il serait judicieux de préalablement administrer l'antagoniste ciblé en concordance avec les cinétiques d'expression des divers ISG afin de s'assurer de leur absence dans la cellule tumorale.

Un autre cas est celui où les cellules tumorales exhibent des défauts dans la signalisation d'IFNAR, soit par la perte du récepteur, soit par des perturbations des éléments de la cascade de signalisation [152]. L'utilisation d'antagonistes d'IFNAR ciblés ne présenterait pas de bénéfices, étant donné le dysfonctionnement constitutif de la voie de signalisation que nous voulons neutraliser.

9.4 Comment expliquer le manque d'efficacité de notre traitement

Comme évoqué, l'action thérapeutique de l'oncolyse virale repose sur deux mécanismes d'action : l'action lytique du virus et le déclenchement de réponses antitumorales. Nos expériences *in vitro* ont démontré que la neutralisation de la voie IFNAR à travers l'antagoniste ciblé permettait au VSV d'infecter les cellules AK7 hCD20 et B16 hCD20 et de les lyser. De plus, nos résultats *in vivo* montrent une augmentation de génome viral dans la tumeur AK7 hCD20 suite à l'administration de la combinaison de VSV et d'antagoniste. Cependant, cette augmentation de la réplication virale du VSV permise par la neutralisation de l'IFNAR tumoral ne se traduit pas par une augmentation de la survie des souris portant des tumeurs AK7 hCD20.

Nous pouvons nous interroger sur la stabilité de l'expression de hCD20 dans la tumeur AK7, et sur l'impact que cela pourrait avoir sur l'efficacité de l'antagoniste ciblé. Comme démontré dans nos résultats complémentaires sur la stabilité de l'expression de hCD20 de notre modèle AK7, la lignée utilisée exhibe une expression stable du hCD20 jusqu'au moins 11 jours post-implantation. Cependant, lors de certaines expériences *in vivo*, où nous mesurons l'expression d'ISG54 dans la tumeur, nous avons observé la présence d'une population de cellules de grande taille CD45- hCD20- qui correspond à environ 30-40 % des évènements enregistrés. Nous ignorons si cette population correspond à

d'autres types de cellules du stroma tumoral, telles que des cellules endothéliales ou des fibroblastes. Une autre possibilité serait celle de cellules tumorales AK7 dont nous ne pouvons plus détecter hCD20 à leur surface, par l'endommagement des épitopes de hCD20. Le processus de dissociation enzymatique/mécanique de la tumeur et de marquage intracellulaire pourrait endommager la surface cellulaire des cellules AK7 hCD20, ce qui expliquerait la présence d'une population de grandes cellules non-immunitaires (CD45-) et hCD20-. Il serait également intéressant de vérifier que l'expression de hCD20 soit homogène dans toute la tumeur à travers des techniques d'histologie, nous donnant une idée si la tumeur entière est susceptible d'être ciblée par l'antagoniste.

Il est également possible que la disparition du hCD20 chez les souris traitées avec l'antagoniste soit due à l'internalisation de hCD20. Dans ce cas, la neutralisation d'IFNAR serait trop courte pour permettre une réplication du VSV soutenue et une propagation dans la tumeur. Il pourrait être pertinent de faire exprimer aux cellules AK7 un hCD20 tronqué dans sa partie cytoplasmique pour éviter son internalisation.

Néanmoins, mes résultats montrent que suite à l'administration de l'antagoniste ciblé hCD20/ α -mIFNAR1, il n'était plus possible de marquer le hCD20 sur les cellules tumorales AK7 dissociées de la tumeur par cytométrie de flux. Ceci semble être une confirmation indirecte que notre antagoniste est bien capable de se fixer à sa cible, causant l'internalisation de hCD20 ou masquant l'épitope reconnu par l'anticorps anti-hCD20 utilisé en cytométrie de flux. Malgré que la fixation de l'antagoniste aux cellules tumorales semble homogène, nous ne connaissons pas l'amplitude de l'infection par le VSV dans la totalité de la tumeur. Il est possible que le VSV en présence de l'antagoniste ne se réplique que dans une petite partie de la tumeur, le reste de celle-ci continuant à croître. De plus, étant donné la courte durée de la neutralisation avec l'antagoniste, nous ne pouvons pas écarter la possibilité que le VSV ne se propage pas assez dans le reste de la tumeur.

Cependant, les résultats préliminaires sur le modèle AK7 IFNAR1_{KO} démontrent l'efficacité du VSV dans des tumeurs insensibles à l'action des IFN de type I, permettant la survie presque totale des souris, spécialement dans le groupe ayant reçu trois injections de VSV. Ces résultats sont en concordance avec d'autres modèles tumoraux

IFNAR1^{KO} où l'administration intratumorale d'un virus oncolytique comme le virus de la vaccine (VV) induit une régression tumorale totale de la tumeur infectée ainsi qu'un effet abscopal dans des tumeurs distantes [228]. Sur cette base, nous pouvons identifier les différences entre le modèle AK7 hCD20 et le modèle AK7 IFNAR1^{KO} afin de trouver des explications à l'inefficacité de l'antagoniste ciblé combiné avec le VSV.

Le type de dysfonctionnement d'IFNAR est un point de différence entre nos deux modèles AK7. Tandis que dans le modèle IFNAR1_{KO}, ce dysfonctionnement est permanent et ne nécessite pas de molécules exogènes, dans le modèle AK7 hCD20, la neutralisation de la signalisation IFNAR est transitoire, car elle est médiée par l'utilisation d'antagonistes ciblés contre IFNAR1. Ceci implique qu'au moment où l'antagoniste est éliminé de l'organisme, les IFN de type I peuvent à nouveau activer l'IFNAR des tumeurs AK7 hCD20. Etant donné que dans nos expériences nous avons décidé d'administrer l'antagoniste toutes les 12 heures, pendant une durée de 2 ou 4 jours, nous pouvons nous interroger si cette fréquence d'injection et cette durée sont suffisantes pour que le VSV induise une lyse suffisamment importante, libérant assez de PAMP pour amorcer une réponse antitumorale [37,245,248].

Dans ce modèle AK7 IFNAR1_{KO}, une différence de croissance entre les lignées AK7 IFNAR1_{KO} et AK7 hCD20 a été observée. En effet, les souris implantées avec des tumeurs AK7 IFNAR1_{KO} exhibent une durée de survie plus élevée que les souris portant des AK7 hCD20. Une des explications possibles est une viabilité *in vivo* réduite des cellules AK7 IFNAR1_{KO}. Une plus faible quantité de cellules tumorales à éliminer, et à dose égale de VSV injectée, augmenterait la multiplicité d'infection dans le modèle AK7 IFNAR1_{KO} vis-à-vis du modèle AK7 hCD20, entraînant une action lytique du VSV plus efficace. Un autre élément pouvant influencer l'efficacité du VSV dans le modèle AK7 IFNAR1_{KO} pourrait être une réponse antivirale atténuée suite à un ralentissement de la réplication du virus. Un cycle cellulaire ralenti peut avoir un impact sur la réplication du VSV, celui-ci ayant besoin de l'entrée dans la phase G1 pour permettre la traduction d'ARN viraux en protéines virales [253]. La magnitude d'une infection virale joue à son tour un rôle important dans l'induction d'une réponse antivirale. Un titre viral faible induit moins de sécrétion d'IFN de type I et donc des réponses immunitaires moins robustes, permettant la persistance du virus pendant plus longtemps [254]. Une meilleure caractérisation de

la lignée AK7 IFNAR1_{KO} pourrait être effectuée afin de déterminer des possibles altérations dans le fonctionnement des cyclines/CDK, ainsi que des régulateurs du cycle cellulaire comme mTOR. Nous pouvons également envisager d'isoler des cellules AK7 IFNAR1_{KO} à partir de tumeurs, les cultiver à nouveau dans des conditions *in vitro* et les réinjecter afin de vérifier si un passage *in vivo* a pu les rendre plus agressives et plus comparables aux lignées AK7 WT ou AK7 hCD20 en terme de vitesse de croissance.

Des nouvelles expériences *in vivo* sur le modèle AK7 IFNAR1_{KO} pourraient éclaircir les questions précédentes. Par exemple, nous pourrions envisager de caractériser l'infiltration tumorale au fil du temps, à travers des techniques d'histologie ou de cytométrie de flux, déterminant à quel moment, si c'est le cas, la tumeur devient « chaude », nous donnant une estimation du temps nécessaire à neutraliser avec notre antagoniste.

9.5 Perspectives du projet

Suite à l'absence d'effet thérapeutique, le projet pourrait suivre plusieurs perspectives regroupées dans deux grands axes : améliorer les paramètres de notre traitement afin d'induire un effet thérapeutique et étudier la réponse immunitaire antitumorale induite par ce traitement.

Concernant l'effet thérapeutique, une des problématiques que nous avons rencontrées lors de notre première expérience de survie *in vivo* en combinant $1,5 \cdot 10^7$ PFUs VSV et notre antagoniste ciblé, est la neurotoxicité induite par le VSV. Nous pensons que le VSV qui se réplique dans la tumeur se répand dans la souris et atteint la dose toxique à partir de laquelle nous observons des effets neurotoxiques. A cause de cela nous avons décidé de réduire la dose de VSV jusqu'à $1,5 \cdot 10^6$ PFU. Cependant les expériences où nous démontrions une augmentation de la réplication du VSV dans la tumeur suite à l'administration de l'antagoniste ciblé avaient été réalisées avec une dose de $1,5 \cdot 10^7$ PFU. Nous n'avons pas d'information sur la réplication du VSV à une dose de $1,5 \cdot 10^6$ PFU, qui pourrait s'avérer trop faible pour atteindre la tumeur et causer un effet lytique. Nous envisageons donc de continuer à de hautes doses malgré les effets secondaires. Le VSV Δ 51, incapable de neutraliser le transport d'ARNm d'IFN- β au cytosol, est plus sensible aux effets antiviraux des IFN de type I [255]. Ce VSV Δ 51 serait probablement moins toxique que le VSV pour les tissus sains et donc mieux toléré chez la souris. Cela

nous permettrait d'injecter de hautes doses de ce virus avec moins d'effets secondaires liés à la réplication virale dans les tissus sains. Un autre aspect déjà abordé avant dans la discussion est la durée de la neutralisation de l'IFNAR tumoral par l'antagoniste ciblé. Suite aux expériences sur l'infiltrat tumoral au fil du temps dans les tumeurs AK7 IFNAR1_{KO} traitées par le VSV, nous pourrions avoir une idée du seuil à atteindre dans la durée de la neutralisation. Nous pourrions donc tester une neutralisation de plus longue durée, et aussi des injections répétées de VSV dans la souris.

Concernant la caractérisation de la réponse antitumorale induite par notre traitement, la réponse IFN de type I étant capable de favoriser les réponses immunitaires innées et adaptatives, elle est capable de transformer des tumeurs « froides » peu immunogéniques en tumeurs « chaudes ». Il serait donc pertinent d'étudier la modification de microenvironnement tumoral suite à la combinaison d'un virus oncolytique et un antagoniste de la signalisation d'IFNAR ciblé. L'infiltrat immunitaire sera donc caractérisé, notamment la fréquence de populations immunitaires de la réponse innée comme les DC, neutrophiles et macrophages, ainsi que des populations de la réponse adaptative comme les lymphocytes T CD8⁺ et lymphocytes T CD4⁺. Egalement, nous étudierons le panel de cytokines libérées suite au traitement avec le VSV et l'antagoniste, ainsi que l'expression de protéines de point de contrôle immunitaire comme PD-L1 et PD1. Ceci sera réalisé à travers des techniques de cytométrie de flux multiparamétrique, complétées par des techniques d'histologie et de transcriptomie. Les résultats obtenus lors de ma thèse ont permis d'obtenir un financement INCA-PLBIO d'une durée de 3 ans, nous permettant de mener à bout les expériences nécessaires pour améliorer l'efficacité de notre traitement et de caractériser la réponse antitumorale. Si cela nous permet de prouver la capacité d'antagonistes ciblés d'IFNAR à améliorer l'effet oncolytique du VSV, ce genre de molécules recombinantes pourrait devenir un outil inestimable pour la recherche scientifique en oncolyse virale et immunothérapie tumorale.

9.6 La versatilité de cette stratégie de ciblage peut être utile sur d'autres cibles

La stratégie de ciblage par avidité peut être utilisée pour moduler la réponse IFN, soit en l'activant sur des populations immunitaires particulières [185,244] soit en la neutralisant,

comme dans le cadre de mon projet de thèse. Nous pourrions également imaginer d'autres applications pour ce genre de molécules recombinantes.

Par exemple, la combinaison d'antagonistes ciblés d'IFNAR et des AcTaferons utilisés dans les travaux de Cauwels et al. Le manque d'efficacité thérapeutique suite au traitement de VSV plus antagoniste ciblé d'IFNAR pourrait être dû à une faible immunogénicité de la tumeur. Comme démontré, les AcTaferons sont capables d'activer la signalisation d'IFNAR dans les DC et d'amorcer une réponse antitumorale totale. Ceci pourrait améliorer la présentation d'antigènes tumoraux libérés par l'action lytique du VSV dans les tumeurs traitées avec l'antagoniste, améliorant potentiellement l'effet thérapeutique.

Ces outils de modulation de la signalisation d'IFNAR peuvent être d'une grande utilité dans la caractérisation du rôle que les IFN de type I peuvent jouer dans les réponses antitumorales. En changeant la cible du nanobody de haute affinité nous pourrions activer ou neutraliser la signalisation d'IFNAR dans une population cellulaire exprimant un marqueur de surface particulier et étudier son impact dans la réponse immunitaire. Par exemple, grâce aux immunocytokines nommées « AcTaFérons », les travaux de Cauwels et al. ont pu démontrer le rôle essentiel de la signalisation d'IFNAR dans les DC Clec9A+ qui activent leur capacité de présentation d'antigènes tumoraux ce qui provoque le rejet des tumeurs [246].

La neutralisation d'IFNAR à travers des antagonistes ciblés comme ceux utilisés dans ce projet pourrait nous permettre de déterminer quelles cellules sont essentielles à l'effet antitumoral induit par la réponse IFN de type I déclenchée par l'oncolyse virale. Ce genre d'antagonistes ciblés serait un outil alternatif à la neutralisation d'une voie de signalisation par des techniques d'édition génétique comme à travers l'utilisation de nucleases de doigts de zinc (ZFN), de « Transcription activator-like effector nucleases » (TALENs) ou de CRISPR/Cas9, beaucoup plus chronophages.

La versatilité de cette technique permet d'échanger les spécificités de ciblage avec d'autres nanobodies ou cytokines mutantes afin de cibler une pléthore de voie de signalisation et de types cellulaires particuliers.

D'autres familles de cytokines comme les interleukines peuvent également devenir des cibles intéressantes. L'IL-2 joue un rôle important dans l'activation et l'expansion de lymphocytes T et de cellules NK antitumorales, cependant l'IL-2 peut également induire l'expansion et activation de lymphocytes CD4⁺ T_{reg}, impliqués dans l'inhibition de réponses immunitaires antitumorales [256]. Afin d'éviter l'activation du récepteur d'IL-2 sur des lymphocytes T_{reg} nous pourrions imaginer utiliser des agonistes ciblés composés par un nanobody de haute affinité contre CD8 ou CD11b et une IL-2 mutante de basse affinité pour son récepteur.

Une autre voie de signalisation impliquée dans la progression tumorale et qui soulève beaucoup d'intérêt dans la thérapie contre le cancer, serait par exemple la voie TGF- β . Tandis que l'activation de cette voie peut engendrer des effets pro-inflammatoires bénéfiques aux réponses immunitaires antitumorales dans le stade initial de la progression tumorale, elle peut également induire la différenciation de fibroblastes associés au cancer (CAF) impliqués dans la remodelisation du stroma tumoral favorable à la tumeur [257,258]. Dans ce cas particulier, nous pourrions donc envisager des antagonistes ciblés composés d'un nanobody de haute affinité contre un marqueur de fibroblaste comme la protéine vimentine (Vim) et un nanobody antagoniste de basse affinité contre un des récepteurs du TGF- β comme TGFBR2. Cependant, l'existence de multiples récepteurs du TGF- β et la complexité de l'activité de cette cytokine selon le type cellulaire et le moment dans la progression tumorale dans lesquels elle agit, rendent ce genre de stratégie assez imprévisible.

10 Conclusions

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis la mise en place de nouvelles molécules recombinantes capables de neutraliser la signalisation d'IFNAR spécifiquement dans les cellules tumorales, en combinaison d'un virus oncolytique comme le VSV. Les antagonistes ciblés α -mIFNAR1 sont capables de neutraliser la signalisation d'IFNAR spécifiquement dans des cellules tumorales exprimant le CD20 humain, inhibant l'expression d'ISG et désactivant les défenses antivirales des cellules tumorales. Ceci permet au VSV de se répliquer spécifiquement dans les cellules cancéreuses dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. Cependant, cette augmentation de la réplication du VSV dans la tumeur traitée avec notre antagoniste ne permet pas jusqu'à présent d'induire un effet thérapeutique robuste.

Plus de recherches sont nécessaires pour élucider les questions concernant l'absence d'effet thérapeutique *in vivo* et les mécanismes immunitaires déclenchés par notre traitement. Finalement, ce nouveau type d'antagoniste ciblé peut être également un puissant outil dans l'étude de la réponse IFN de type I, permettant une neutralisation spécifique à des populations cellulaires exprimant un marqueur de surface particulier sans avoir recours à des techniques d'édition génétique.

11 Bibliographie

- [1] T. Kawasaki, T. Kawai, Toll-like receptor signaling pathways, *Front. Immunol.* 5 (2014) 461. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>.
- [2] P.E. Bunney, A.N. Zink, A.A. Holm, C.J. Billington, C.M. Kotz, Orexin activation counteracts decreases in nonexercise activity thermogenesis (NEAT) caused by high-fat diet, *Physiol. Behav.* 176 (2017) 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>.
- [3] A.L. Blasius, B. Beutler, Intracellular Toll-like Receptors, *Immunity.* 32 (2010) 305–315. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.03.012>.
- [4] Y. Kumagai, O. Takeuchi, S. Akira, TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 795–804. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.12.004>.
- [5] S. Zhou, E.A. Kurt-Jones, K.A. Fitzgerald, J.P. Wang, A.M. Cerny, M. Chan, R.W. Finberg, Role of MyD88 in Route-Dependent Susceptibility to Vesicular Stomatitis Virus Infection, *J. Immunol.* 178 (2007) 5173–5181. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.8.5173>.
- [6] J. Lee, M.G. Ghonime, R. Wang, K.A. Cassady, The Antiviral Apparatus: STING and Oncolytic Virus Restriction., *Mol. Ther. Oncolytics.* 13 (2019) 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2019.02.002>.
- [7] G.N. Barber, STING: Infection, inflammation and cancer, *Nat. Rev. Immunol.* 15 (2015) 760–770. <https://doi.org/10.1038/nri3921>.
- [8] X. Cai, Y.H. Chiu, Z.J. Chen, The cGAS-cGAMP-STING pathway of cytosolic DNA sensing and signaling, *Mol. Cell.* 54 (2014) 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.040>.
- [9] K.T. Chow, M. Gale, Y.-M. Loo, RIG-I and Other RNA Sensors in Antiviral Immunity, *Annu. Rev. Immunol.* 36 (2018) 667–694. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053309>.
- [10] M. Yoneyama, M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi,

- K. Taira, S. Akira, T. Fujita, The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses, *Nat. Immunol.* 5 (2004) 730–737. <https://doi.org/10.1038/ni1087>.
- [11] Y.-M. Loo, M. Gale, Jr., Immune signaling by RIG-I-like receptors., *Immunity.* 34 (2011) 680–92. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.003>.
- [12] S.-R. Woo, L. Corrales, T.F. Gajewski, Innate Immune Recognition of Cancer, *Annu. Rev. Immunol.* 33 (2015) 445–474. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112043>.
- [13] T. Su, Y. Zhang, K. Valerie, X.Y. Wang, S. Lin, G. Zhu, STING activation in cancer immunotherapy, *Theranostics.* 9 (2019) 7759–7771. <https://doi.org/10.7150/thno.37574>.
- [14] T. Li, Z.J. Chen, The cGAS-cGAMP-STING pathway connects DNA damage to inflammation, senescence, and cancer, *J. Exp. Med.* 215 (2018) 1287–1299. <https://doi.org/10.1084/jem.20180139>.
- [15] T. Abe, A. Harashima, T. Xia, H. Konno, K. Konno, A. Morales, J. Ahn, D. Gutman, G.N. Barber, STING Recognition of Cytoplasmic DNA Instigates Cellular Defense, *Mol. Cell.* 50 (2013) 5–15. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.039>.
- [16] G. Dunphy, S.M. Flannery, J.F. Almine, D.J. Connolly, C. Paulus, K.L. Jønsson, M.R. Jakobsen, M.M. Nevels, A.G. Bowie, L. Unterholzner, Non-canonical Activation of the DNA Sensing Adaptor STING by ATM and IFI16 Mediates NF-κB Signaling after Nuclear DNA Damage, *Mol. Cell.* 71 (2018) 745-760.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.07.034>.
- [17] A.P. West, G.S. Shadel, S. Ghosh, Mitochondria in innate immune responses, *Nat. Rev. Immunol.* 11 (2011) 389–402. <https://doi.org/10.1038/nri2975>.
- [18] S.W.G. Tait, D.R. Green, Mitochondria and cell signalling, *J. Cell Sci.* 125 (2012) 807–815. <https://doi.org/10.1242/jcs.099234>.
- [19] S.W.G. Tait, D.R. Green, Mitochondrial regulation of cell death, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5 (2013). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008706>.

- [20] E. Giampazolias, S.W.G. Tait, Mitochondria and the hallmarks of cancer, *FEBS J.* 283 (2016) 803–814. <https://doi.org/10.1111/febs.13603>.
- [21] S. Liu, M. Feng, W. Guan, Mitochondrial DNA sensing by STING signaling participates in inflammation, cancer and beyond, *Int. J. Cancer.* 139 (2016) 736–741. <https://doi.org/10.1002/ijc.30074>.
- [22] K.L. Singel, K.S. Grzankowski, A.N.M.N.H. Khan, M.J. Grimm, A.C. D’Auria, K. Morrell, K.H. Eng, B. Hylander, P.C. Mayor, T.R. Emmons, N. Lénárt, R. Fekete, Z. Környei, U. Muthukrishnan, J.D. Gilthorpe, C.F. Urban, K. Itagaki, C.J. Hauser, C. Leifer, K.B. Moysich, K. Odunsi, Á. Dénes, B.H. Segal, Mitochondrial DNA in the tumour microenvironment activates neutrophils and is associated with worse outcomes in patients with advanced epithelial ovarian cancer, *Br. J. Cancer.* 120 (2019) 207–217. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0339-8>.
- [23] J. Göke, H.H. Ng, CTRL + INSERT : retrotransposons and their contribution to regulation and innovation of the transcriptome , *EMBO Rep.* 17 (2016) 1131–1144. <https://doi.org/10.15252/embr.201642743>.
- [24] N. Grandi, E. Tramontano, Human endogenous retroviruses are ancient acquired elements still shaping innate immune responses, *Front. Immunol.* 9 (2018) 2039. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02039>.
- [25] F. Wang-Johanning, M. Li, F.J. Esteva, K.R. Hess, B. Yin, K. Rycaj, J.B. Plummer, J.G. Garza, S. Ambs, G.L. Johanning, Human endogenous retrovirus type K antibodies and mRNA as serum biomarkers of early-stage breast cancer, *Int. J. Cancer.* 134 (2014) 587–595. <https://doi.org/10.1002/ijc.28389>.
- [26] I. Cañadas, R. Thummalapalli, J.W. Kim, S. Kitajima, R.W. Jenkins, C.L. Christensen, M. Campisi, Y. Kuang, Y. Zhang, E. Gjini, G. Zhang, T. Tian, D.R. Sen, D. Miao, Y. Imamura, T. Thai, B. Piel, H. Terai, A.R. Aref, T. Hagan, S. Koyama, M. Watanabe, H. Baba, A.E. Adeni, C.A. Lydon, P. Tamayo, Z. Wei, M. Herlyn, T.U. Barbie, R. Uppaluri, L.M. Sholl, E. Sicinska, J. Sands, S. Rodig, K.K. Wong, C.P. Paweletz, H. Watanabe, D.A. Barbie, Tumor innate immunity primed by specific interferon-stimulated endogenous retroviruses, *Nat. Med.* 24 (2018) 1143–1150. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0116-5>.

- [27] A. Panda, A.A. de Cubas, M. Stein, G. Riedlinger, J. Kra, T. Mayer, C.C. Smith, B.G. Vincent, J.S. Serody, K.E. Beckermann, S. Ganesan, G. Bhanot, W.K. Rathmell, Endogenous retrovirus expression is associated with response to immune checkpoint blockade in clear cell renal cell carcinoma, *JCI Insight*. 3 (2018). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.121522>.
- [28] T.P. Hurst, G. Magiorkinis, Activation of the innate immune response by endogenous retroviruses, *J. Gen. Virol.* 96 (2015) 1207–1218. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000017>.
- [29] T. Yamazaki, C. Vanpouille-Box, S. Demaria, L. Galluzzi, Immunogenic Cell Death Driven by Radiation—Impact on the Tumor Microenvironment, in: *Cancer Treat. Res.*, *Cancer Treat Res*, 2020: pp. 281–296. https://doi.org/10.1007/978-3-030-38862-1_10.
- [30] C. Vanpouille-Box, S.C. Formenti, S. Demaria, Toward precision radiotherapy for use with immune checkpoint blockers, *Clin. Cancer Res.* 24 (2018) 259–265. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0037>.
- [31] A. Sistigu, T. Yamazaki, E. Vacchelli, K. Chaba, D.P. Enot, J. Adam, I. Vitale, A. Goubar, E.E. Baracco, C. Remédios, L. Fend, D. Hannani, L. Aymeric, Y. Ma, M. Niso-Santano, O. Kepp, J.L. Schultze, T. Tüting, F. Belardelli, L. Bracci, V. La Sorsa, G. Ziccheddu, P. Sestili, F. Urbani, M. Delorenzi, M. Lacroix-Triki, V. Quidville, R. Conforti, J.P. Spano, L. Pusztai, V. Poirier-Colame, S. Delaloge, F. Penault-Llorca, S. Ladoire, L. Arnould, J. Cyrta, M.C. Dessoliers, A. Eggermont, M.E. Bianchi, M. Pittet, C. Engblom, C. Pfirschke, X. Prévile, G. Uzè, R.D. Schreiber, M.T. Chow, M.J. Smyth, E. Proietti, F. André, G. Kroemer, L. Zitvogel, Cancer cell–autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy, *Nat. Med.* 20 (2014) 1301–1309. <https://doi.org/10.1038/NM.3708>.
- [32] D. Roulois, H. Loo Yau, R. Singhanian, Y. Wang, A. Danesh, S.Y. Shen, H. Han, G. Liang, P.A. Jones, T.J. Pugh, C. O’Brien, D.D. De Carvalho, DNA-Demethylating Agents Target Colorectal Cancer Cells by Inducing Viral Mimicry by Endogenous Transcripts, *Cell*. 162 (2015) 961–973. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.056>.
- [33] M.R. Patel, B.A. Jacobson, Y. Ji, J. Drees, S. Tang, K. Xiong, H. Wang, J.E. Prigge, A.S.

- Dash, A.K. Kratzke, E. Mesev, R. Etchison, M.J. Federspiel, S.J. Russell, R.A. Kratzke, Vesicular stomatitis virus expressing interferon- β is oncolytic and promotes antitumor immune responses in a syngeneic murine model of non-small cell lung cancer, *Oncotarget*. 6 (2015) 33165. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.5320>.
- [34] Y. Endo, R. Sakai, M. Ouchi, H. Onimatsu, M. Hioki, S. Kagawa, F. Uno, Y. Watanabe, Y. Urata, N. Tanaka, T. Fujiwara, Virus-mediated oncolysis induces danger signal and stimulates cytotoxic T-lymphocyte activity via proteasome activator upregulation, *Oncogene*. 27 (2008) 2375–2381. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210884>.
- [35] Z.S. Guo, Z. Liu, D.L. Bartlett, Oncolytic immunotherapy: Dying the right way is a key to eliciting potent antitumor immunity, *Front. Oncol.* 4 APR (2014). <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00074>.
- [36] L. Russell, K.W. Peng, S.J. Russell, R.M. Diaz, Oncolytic Viruses: Priming Time for Cancer Immunotherapy, *BioDrugs*. 33 (2019) 485–501. <https://doi.org/10.1007/s40259-019-00367-0>.
- [37] S. Gujar, J.G. Pol, Y. Kim, P.W. Lee, G. Kroemer, Antitumor Benefits of Antiviral Immunity: An Underappreciated Aspect of Oncolytic Virotherapies., *Trends Immunol.* 0 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.11.006>.
- [38] B. Huang, R. Sikorski, D.H. Kirn, S.H. Thorne, Synergistic anti-tumor effects between oncolytic vaccinia virus and paclitaxel are mediated by the IFN response and HMGB1, *Gene Ther.* 18 (2011) 164–172. <https://doi.org/10.1038/gt.2010.121>.
- [39] L. Deng, H. Liang, M. Xu, X. Yang, B. Burnette, A. Arina, X.D. Li, H. Mauceri, M. Beckett, T. Darga, X. Huang, T.F. Gajewski, Z.J. Chen, Y.X. Fu, R.R. Weichselbaum, STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors, *Immunity*. 41 (2014) 843–852. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2014.10.019>.
- [40] A. Isaacs, J. Lindenmann, Virus interference. I. The interferon, *Proc. R. Soc. London*.

- Ser. B - Biol. Sci. 147 (1957) 258–267. <https://doi.org/10.1098/rspb.1957.0048>.
- [41] Y. Nagano, Y. Kojima, Inhibition of vaccinal infection by a liquid factor in tissue infected by homologous virus. III. Serological properties of the inhibitory factor, C. R. Seances Soc. Biol. Fil. 154 (1960) 2172–2175. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13639454> (accessed May 6, 2020).
- [42] Y. Watanabe, Fifty years of interference, Nat. Immunol. 5 (2004) 1193. <https://doi.org/10.1038/ni1204-1193>.
- [43] B.R. Jones, D.J. Coster, M.G. Falcon, K. Cantell, Topical therapy of ulcerative herpetic keratitis with human interferon, Lancet. 2 (1976) 128. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(76\)92850-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(76)92850-6).
- [44] W. Berthold, C. Tan, Y.H. Tan, Purification and in vitro labeling of interferon from a human fibroblastoid cell line, J. Biol. Chem. 253 (1978) 5206–5212.
- [45] S. Pestka, The interferons: 50 Years after their discovery, there is much more to learn, J. Biol. Chem. 282 (2007) 20047–20051. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700004200>.
- [46] M. Rubinstein, W.P. Levy, J.A. Moschera, C.Y. Lai, R.D. Hershberg, R.T. Bartlett, S. Pestka, Human leukocyte interferon: Isolation and characterization of several molecular forms, Arch. Biochem. Biophys. 210 (1981) 307–318. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(81\)90194-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(81)90194-6).
- [47] S.R. Sprang, J.F. Bazan, Cytokine structural taxonomy and mechanisms of receptor engagement, (1993) 815–827.
- [48] M. Karpusas, M. Nolte, C.B. Benton, W. Meier, W.N. Lipscomb, S. Goelz, The crystal structure of human interferon β at 2.2-Å resolution, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94 (1997) 11813–11818. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.22.11813>.
- [49] C.T. Ng, J.L. Mendoza, K.C. Garcia, M.B.A. Oldstone, Alpha and Beta Type 1 Interferon Signaling: Passage for Diverse Biologic Outcomes, Cell. 164 (2016) 349–352. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.027>.
- [50] C. Thomas, I. Moraga, D. Levin, P.O. Krutzik, Y. Podoplelova, A. Trejo, C. Lee, G.

- Yarden, S.E. Vleck, J.S. Glenn, G.P. Nolan, J. Piehler, G. Schreiber, K.C. Garcia, Structural linkage between ligand discrimination and receptor activation by Type I interferons, *Cell*. 146 (2011) 621–632. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.048>.
- [51] V. van Pesch, H. Lanaya, J.-C. Renauld, T. Michiels, Characterization of the Murine Alpha Interferon Gene Family, *J. Virol.* 78 (2004) 8219–8228. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.15.8219-8228.2004>.
- [52] J. Bekisz, H. Schmeisser, J. Hernandez, N.D. Goldman, K.C. Zoon, Human interferons alpha, beta and omega, *Growth Factors*. 22 (2004) 243–251. <https://doi.org/10.1080/08977190400000833>.
- [53] K. Gibbert, J.F. Schlaak, D. Yang, U. Dittmer, *IFN- α subtypes: Distinct biological activities in anti-viral therapy*, Wiley-Blackwell, 2013. <https://doi.org/10.1111/bph.12010>.
- [54] M. Revel, *Interferon-beta. Structure, differential actions, and medical applications*, 1997. [https://doi.org/10.1016/S1874-5687\(97\)80034-1](https://doi.org/10.1016/S1874-5687(97)80034-1).
- [55] T.B. Lavoie, E. Kalie, S. Crisafulli-Cabatu, R. Abramovich, G. DiGioia, K. Moolchan, S. Pestka, G. Schreiber, Binding and activity of all human alpha interferon subtypes, *Cytokine*. 56 (2011) 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.07.019>.
- [56] T.B. Lavoie, E. Kalie, S. Crisafulli-Cabatu, R. Abramovich, G. DiGioia, K. Moolchan, S. Pestka, G. Schreiber, Binding and activity of all human alpha interferon subtypes, *Cytokine*. 56 (2011) 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.07.019>.
- [57] D.A. Jaitin, L.C. Roisman, E. Jaks, J. Piehler, J. Van Der Heyden, G. Uze, G. Schreiber, M. Gavutis, Inquiring into the Differential Action of Interferons (IFNs): an IFN- α 2 Mutant with Enhanced Affinity to IFNAR1 Is Functionally Similar to IFN- β Inquiring into the Differential Action of Interferons (IFNs): an IFN- α 2 Mutant with Enhanced Affinity, 26 (2014) 1888–1897. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.5.1888>.

- [58] G. Uzé, G. Lutfalla, I. Gresser, Genetic transfer of a functional human interferon α receptor into mouse cells: Cloning and expression of its c-DNA, *Cell*. 60 (1990) 225–234. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90738-Z](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90738-Z).
- [59] G. Lutfalla, S.J. Holland, E. Cinato, D. Monneron, J. Reboul, N.C. Rogers, J.M. Smith, G.R. Stark, K. Gardiner, K.E. Mogensen, Mutant U5A cells are complemented by an interferon-alpha beta receptor subunit generated by alternative processing of a new member of a cytokine receptor gene cluster., *EMBO J*. 14 (1995) 5100–5108. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00192.x>.
- [60] D. Novick, B. Cohen, M. Rubinstein, The human interferon α β receptor: Characterization and molecular cloning, *Cell*. 77 (1994) 391–400. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90154-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90154-6).
- [61] G. Lutfalla, S.J. Holland, E. Cinato, D. Monneron, J. Reboul, N.C. Rogers, J.M. Smith, G.R. Stark, K. Gardiner, K.E. Mogensen, I.M. Kerr, G. Uzé, Mutant U5A cells are complemented by an interferon- $\alpha\beta$ receptor subunit generated by alternative processing of a new member of a cytokine receptor gene cluster, *EMBO J*. 14 (1995) 5100–5108. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00192.x>.
- [62] P. Domanski, E. Fish, O.W. Nadeau, M. Witte, L.C. Plataniias, H. Yan, J. Krolewski, P. Pitha, O.R. Colamonici, A region of the β subunit of the interferon α receptor different from Box 1 interacts with Jak1 and is sufficient to activate the Jak-Stat pathway and induce an antiviral state, *J. Biol. Chem*. 272 (1997) 26388–26393. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.42.26388>.
- [63] G. Uzé, G. Schreiber, J. Piehler, S. Pellegrini, The receptor of the type I interferon family, *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 316 (2007) 71–95. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-71329-6-5>.
- [64] K.E. Mogensen, M. Lewerenz, J. Reboul, G. Lutfalla, G. Uzé, The type I interferon receptor: Structure, function, and evolution of a family business, *J. Interf. Cytokine Res*. 19 (1999) 1069–1098. <https://doi.org/10.1089/107999099313019>.
- [65] P. Lamken, M. Gavutis, I. Peters, J. Van Der Heyden, G. Uzé, J. Piehler, Functional cartography of the ectodomain of the type I interferon receptor subunit ifnar1, *J.*

- Mol. Biol. 350 (2005) 476–488. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.05.008>.
- [66] H.J.A. Wallweber, C. Tam, Y. Franke, M.A. Starovasnik, P.J. Lupardus, Structural basis of recognition of interferon- α receptor by tyrosine kinase 2, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21 (2014) 443–448. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2807>.
- [67] S. Wilmes, O. Beutel, Z. Li, V. Francois-Newton, C.P. Richter, D. Janning, C. Kroll, P. Hanhart, K. Hötte, C. You, G. Uzé, S. Pellegrini, J. Piehler, Receptor dimerization dynamics as a regulatory valve for plasticity of type I interferon signaling, *J. Cell Biol.* 209 (2015) 579–593. <https://doi.org/10.1083/jcb.201412049>.
- [68] H. Sierra, M. Cordova, C.S.J. Chen, M. Rajadhyaksha, Confocal imaging-guided laser ablation of basal cell carcinomas: An ex vivo study, *J. Invest. Dermatol.* 135 (2015) 612–615. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>.
- [69] J. Piehler, C. Thomas, K. Christopher Garcia, G. Schreiber, Structural and dynamic determinants of type I interferon receptor assembly and their functional interpretation, *Immunol. Rev.* 250 (2012) 317–334. <https://doi.org/10.1111/imr.12001>.
- [70] E. Jaks, M. Gavutis, G. Uzé, J. Martal, J. Piehler, Differential Receptor Subunit Affinities of Type I Interferons Govern Differential Signal Activation, *J. Mol. Biol.* 366 (2007) 525–539. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.11.053>.
- [71] E. Kalie, D.A. Jaitin, Y. Podoplelova, J. Piehler, G. Schreiber, The stability of the ternary interferon-receptor complex rather than the affinity to the individual subunits dictates differential biological activities, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 32925–32936. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806019200>.
- [72] V. François-Newton, G. Magno de Freitas Almeida, B. Payelle-Brogard, D. Monneron, L. Pichard-Garcia, J. Piehler, S. Pellegrini, G. Uzé, USP18-Based Negative Feedback Control Is Induced by Type I and Type III Interferons and Specifically Inactivates Interferon α Response, *PLoS One.* 6 (2011) e22200. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022200>.
- [73] O.A. Malakhova, K. Il Kim, J.K. Luo, W. Zou, K.G.S. Kumar, S.Y. Fuchs, K. Shuai, D.E. Zhang, UBP43 is a novel regulator of interferon signaling independent of its ISG15

- isopeptidase activity, *EMBO J.* 25 (2006) 2358–2367.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601149>.
- [74] R.A.R. Piganis, N.A. De Weerd, J.A. Gould, C.W. Schindler, A. Mansell, S.E. Nicholson, P.J. Hertzog, Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) 1 inhibits type I interferon (IFN) signaling via the interferon α receptor (IFNAR1)-associated tyrosine kinase tyk2, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 33811–33818.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.270207>.
- [75] J.E. Fenner, R. Starr, A.L. Cornish, J.G. Zhang, D. Metcalf, R.D. Schreiber, K. Sheehan, D.J. Hilton, W.S. Alexander, P.J. Hertzog, Suppressor of cytokine signaling 1 regulates the immune response to infection by a unique inhibition of type I interferon activity, *Nat. Immunol.* 7 (2006) 33–39.
<https://doi.org/10.1038/ni1287>.
- [76] P. Sheppard, W. Kindsvogel, W. Xu, K. Henderson, S. Schlutsmeyer, T.E. Whitmore, R. Kuestner, U. Garrigues, C. Birks, J. Roraback, C. Ostrander, D. Dong, J. Shin, S. Presnell, B. Fox, B. Haldeman, E. Cooper, D. Taft, T. Gilbert, F.J. Grant, M. Tackett, W. Krivan, G. McKnight, C. Clegg, D. Foster, K.M. Klucher, IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R, *Nat. Immunol.* 4 (2003) 63–68.
<https://doi.org/10.1038/ni873>.
- [77] M.L. Stanifer, K. Pervolaraki, S. Boulant, Differential regulation of type I and type III interferon signaling, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019).
<https://doi.org/10.3390/ijms20061445>.
- [78] N. Ank, M.B. Iversen, C. Bartholdy, P. Staeheli, R. Hartmann, U.B. Jensen, F. Dagnaes-Hansen, A.R. Thomsen, Z. Chen, H. Haugen, K. Klucher, S.R. Paludan, An Important Role for Type III Interferon (IFN- λ /IL-28) in TLR-Induced Antiviral Activity, *J. Immunol.* 180 (2008) 2474–2485.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.4.2474>.
- [79] T. Mahlaköiv, P. Hernandez, K. Gronke, A. Diefenbach, P. Staeheli, Leukocyte-Derived IFN- α/β and Epithelial IFN- λ Constitute a Compartmentalized Mucosal Defense System that Restricts Enteric Virus Infections, *PLoS Pathog.* 11 (2015) e1004782. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004782>.

- [80] M. Numasaki, M. Tagawa, F. Iwata, T. Suzuki, A. Nakamura, M. Okada, Y. Iwakura, S. Aiba, M. Yamaya, IL-28 Elicits Antitumor Responses against Murine Fibrosarcoma, *J. Immunol.* 178 (2007) 5086–5098. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.8.5086>.
- [81] W.M. Schneider, M.D. Chevillotte, C.M. Rice, Interferon-stimulated genes: A complex web of host defenses, *Annu. Rev. Immunol.* 32 (2014) 513–545. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120231>.
- [82] J.W. Schoggins, S.J. Wilson, M. Panis, M.Y. Murphy, C.T. Jones, P. Bieniasz, C.M. Rice, A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response, *Nature.* 472 (2011) 481–485. <https://doi.org/10.1038/nature09907>.
- [83] C.C. Bailey, G. Zhong, I.-C. Huang, M. Farzan, IFITM-Family Proteins: The Cell's First Line of Antiviral Defense, *Annu. Rev. Virol.* 1 (2014) 261–283. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085537>.
- [84] A.L. Brass, I.C. Huang, Y. Benita, S.P. John, M.N. Krishnan, E.M. Feeley, B.J. Ryan, J.L. Weyer, L. van der Weyden, E. Fikrig, D.J. Adams, R.J. Xavier, M. Farzan, S.J. Eledge, The IFITM Proteins Mediate Cellular Resistance to Influenza A H1N1 Virus, West Nile Virus, and Dengue Virus, *Cell.* 139 (2009) 1243–1254. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.017>.
- [85] K. Li, R.M. Markosyan, Y.M. Zheng, O. Golfetto, B. Bungart, M. Li, S. Ding, Y. He, C. Liang, J.C. Lee, E. Gratton, F.S. Cohen, S.L. Liu, IFITM Proteins Restrict Viral Membrane Hemifusion, *PLoS Pathog.* 9 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003124>.
- [86] S.Y. Liu, R. Aliyari, K. Chikere, G. Li, M.D. Marsden, J.K. Smith, O. Pernet, H. Guo, R. Nusbaum, J.A. Zack, A.N. Freiberg, L. Su, B. Lee, G. Cheng, Interferon-Inducible Cholesterol-25-Hydroxylase Broadly Inhibits Viral Entry by Production of 25-Hydroxycholesterol, *Immunity.* 38 (2013) 92–105. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.005>.
- [87] M. Blanc, W.Y. Hsieh, K.A. Robertson, K.A. Kropp, T. Forster, G. Shui, P. Lacaze, S.

- Watterson, S.J. Griffiths, N.J. Spann, A. Meljon, S. Talbot, K. Krishnan, D.F. Covey, M.R. Wenk, M. Craigon, Z. Ruzsics, J. Haas, A. Angulo, W.J. Griffiths, C.K. Glass, Y. Wang, P. Ghazal, The Transcription Factor STAT-1 Couples Macrophage Synthesis of 25-Hydroxycholesterol to the Interferon Antiviral Response, *Immunity*. 38 (2013) 106–118. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.004>.
- [88] K.P. Anderson, E.H. Fennie, Adenovirus early region 1A modulation of interferon antiviral activity., *J. Virol.* 61 (1987) 787–95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3027405> (accessed October 1, 2019).
- [89] A.C. Dar, T.E. Dever, F. Sicheri, Higher-order substrate recognition of eIF2 α by the RNA-dependent protein kinase PKR, *Cell*. 122 (2005) 887–900. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.044>.
- [90] J. Hershey, Translational Control In Mammalian Cells, *Annu. Rev. Biochem.* 60 (1991) 717–755. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.60.1.717>.
- [91] M.S. Diamond, M. Farzan, The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins, *Nat. Rev. Immunol.* 13 (2013) 46–57. <https://doi.org/10.1038/nri3344>.
- [92] A. Pichlmair, C. Lassnig, C.A. Eberle, M.W. Górna, C.L. Baumann, T.R. Burkard, T. Búrckstúmmér, A. Stefanovic, S. Krieger, K.L. Bennett, T. Rúlicke, F. Weber, J. Colinge, M. Müller, G. Superti-Furga, IFIT1 is an antiviral protein that recognizes 5'-triphosphate RNA, *Nat. Immunol.* 12 (2011) 624–630. <https://doi.org/10.1038/ni.2048>.
- [93] F. Terenzi, P. Saikia, G.C. Sen, Interferon-inducible protein, P56, inhibits HPV DNA replication by binding to the viral protein E1, *EMBO J.* 27 (2008) 3311–3321. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.241>.
- [94] A. Levine, Remembrance of Things Past, 2013. <https://doi.org/10.1080/15582159.2013.817869>.
- [95] M. Malumbres, Cyclin-dependent kinases, *Genome Biol.* 15 (2014) 122. <https://doi.org/10.1186/gb4184>.

- [96] O. Sangfelt, S. Erickson, S. Einhorn, D. Grandér, Induction of Cip/Kip and Ink4 cyclin dependent kinase inhibitors by interferon- α in hematopoietic cell lines, 1997. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1200832>.
- [97] P.S. Subramaniam, P.E. Cruz, A.C. Hobeika, H.M. Johnson, Type I interferon induction of the cdk-inhibitor p21(WAF1) is accompanied by ordered G1 arrest, differentiation and apoptosis of the Daudi B-cell line, 1998. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201712>.
- [98] S. Vijayaraghavan, S. Moulder, K. Keyomarsi, R.M. Layman, Inhibiting CDK in Cancer Therapy: Current Evidence and Future Directions, *Target. Oncol.* 13 (2018) 21–38. <https://doi.org/10.1007/s11523-017-0541-2>.
- [99] G.I. Shapiro, Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment, *J. Clin. Oncol.* 24 (2006) 1770–1783. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.03.7689>.
- [100] S. Balachandran, C.N. Kim, W.C. Yeh, T.W. Mak, K. Bhalla, G.N. Barber, Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling, 1998. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.23.6888>.
- [101] S. Balachandran, P.C. Roberts, T. Kipperman, K.N. Bhalla, R.W. Compans, D.R. Archer, G.N. Barber, Alpha/Beta Interferons Potentiate Virus-Induced Apoptosis through Activation of the FADD/Caspase-8 Death Signaling Pathway, *J. Virol.* 74 (2000) 1513–1523. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.3.1513-1523.2000>.
- [102] P.K. Kim, A. Dutra, J.M. Puck, Genome structure and mapping of human fadd. An intracellular mediator of lymphocyte apoptosis, 1996. <https://doi.org/10.1042/bst024571s>.
- [103] A. R Safa, Roles of c-FLIP in Apoptosis, Necroptosis, and Autophagy, *J. Carcinog. Mutagen. Suppl* 6 (2013). <https://doi.org/10.4172/2157-2518.s6-003>.
- [104] J. McCullough, A.K. Clippinger, N. Talledge, M.L. Skowyra, M.G. Saunders, T. V. Naismith, L.A. Colf, P. Afonine, C. Arthur, W.I. Sundquist, P.I. Hanson, A. Frost, Structure and membrane remodeling activity of ESCRT-III helical polymers, *Science.* 350 (2015) 1548. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAD8305>.

- [105] K.J. Ritchie, D.E. Zhang, ISG15: The immunological kin of ubiquitin, *Semin. Cell Dev. Biol.* 15 (2004) 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2003.12.005>.
- [106] A. Pincetic, Z. Kuang, E.J. Seo, J. Leis, The Interferon-Induced Gene ISG15 Blocks Retrovirus Release from Cells Late in the Budding Process, *J. Virol.* 84 (2010) 4725–4736. <https://doi.org/10.1128/jvi.02478-09>.
- [107] K.A. Fitzgerald, The Interferon Inducible Gene: Viperin, *J. Interf. Cytokine Res.* 31 (2011) 131. <https://doi.org/10.1089/JIR.2010.0127>.
- [108] C. Kurokawa, I.D. Iankov, E. Galanis, A key anti-viral protein, RSAD2/VIPERIN, restricts the release of Measles virus in infected cells, *Virus Res.* 263 (2019) 145. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2019.01.014>.
- [109] X. Wang, E.R. Hinson, P. Cresswell, The Interferon-Inducible Protein Viperin Inhibits Influenza Virus Release by Perturbing Lipid Rafts, *Cell Host Microbe.* 2 (2007) 96–105. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2007.06.009>.
- [110] D. Perez-Caballero, T. Zang, A. Ebrahimi, M.W. McNatt, D.A. Gregory, M.C. Johnson, P.D. Bieniasz, Tetherin Inhibits HIV-1 Release by Directly Tethering Virions to Cells, *Cell.* 139 (2009) 499–511. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.039>.
- [111] P.H. Jones, H. V Mehta, M. Maric, R.J. Roller, C.M. Okeoma, Bone marrow stromal cell antigen 2 (BST-2) restricts mouse mammary tumor virus (MMTV) replication in vivo, *Retrovirology.* 9 (2012) 10. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-9-10>.
- [112] J. Verhelst, P. Hulpiau, X. Saelens, Mx Proteins: Antiviral Gatekeepers That Restrain the Uninvited, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77 (2013) 551–566. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00024-13>.
- [113] T. Zürcher, J. Pavlovic, P. Staeheli, Mouse Mx2 protein inhibits vesicular stomatitis virus but not influenza virus, *Virology.* 187 (1992) 796–800. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90481-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90481-4).
- [114] H.K. Jin, A. Takada, Y. Kon, O. Haller, T. Watanabe, Identification of the Murine Mx2 Gene: Interferon-Induced Expression of the Mx2 Protein from the Feral

- Mouse Gene Confers Resistance to Vesicular Stomatitis Virus, *J. Virol.* 73 (1999) 4925–4930. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.6.4925-4930.1999>.
- [115] C.E. Samuel, Antiviral actions of interferons., *Clin. Microbiol. Rev.* 14 (2001) 778–809, table of contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.778-809.2001>.
- [116] R.M. Krug, M. Shaw, B. Broni, G. Shapiro, O. Haller, Inhibition of influenza viral mRNA synthesis in cells expressing the interferon-induced Mx gene product., *J. Virol.* 56 (1985) 201–206. <https://doi.org/10.1128/jvi.56.1.201-206.1985>.
- [117] P. Zimmermann, B. Manz, O. Haller, M. Schwemmler, G. Kochs, The Viral Nucleoprotein Determines Mx Sensitivity of Influenza A Viruses, *J. Virol.* 85 (2011) 8133–8140. <https://doi.org/10.1128/jvi.00712-11>.
- [118] P.E. Nigg, J. Pavlovic, Oligomerization and GTP-binding requirements of MxA for viral target recognition and antiviral activity against influenza A virus, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 29893–29906. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.681494>.
- [119] M.B. Fuertes, A.K. Kacha, J. Kline, S.-R. Woo, D.M. Kranz, K.M. Murphy, T.F. Gajewski, Host type I IFN signals are required for antitumor CD8⁺ T cell responses through CD8 α ⁺ dendritic cells, *J. Exp. Med.* 208 (2011) 2005. <https://doi.org/10.1084/JEM.20101159>.
- [120] M.S. Diamond, M. Kinder, H. Matsushita, M. Mashayekhi, G.P. Dunn, J.M. Archambault, H. Lee, C.D. Arthur, J.M. White, U. Kalinke, K.M. Murphy, R.D. Schreiber, Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors, *J. Exp. Med.* 208 (2011) 1989. <https://doi.org/10.1084/JEM.20101158>.
- [121] J. Klein, Seeds of time: Fifty years ago Peter A. Gorer discovered the H-2 complex, *Immunogenetics.* 24 (1986) 331–338. <https://doi.org/10.1007/BF00377947>.
- [122] M.L.M. Jongsma, G. Guarda, R.M. Spaapen, The regulatory network behind MHC class I expression, *Mol. Immunol.* 113 (2019) 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.12.005>.
- [123] H.G. Rammensee, K. Falk, O. Rötzschke, MHC molecules as peptide receptors,

- Curr. Opin. Immunol. 5 (1993) 35–44. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(93\)90078-7](https://doi.org/10.1016/0952-7915(93)90078-7).
- [124] J.P. Böttcher, C. Reis e Sousa, The Role of Type 1 Conventional Dendritic Cells in Cancer Immunity, *Trends in Cancer*. 4 (2018) 784–792. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2018.09.001>.
- [125] X. Chen, S. Liu, M.U. Goraya, M. Maarouf, S. Huang, J.L. Chen, Host immune response to influenza A virus infection, *Front. Immunol.* 9 (2018). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00320>.
- [126] G. Franzoni, S. Dei Giudici, A. Oggiano, Infection, modulation and responses of antigen-presenting cells to African swine fever viruses, *Virus Res.* 258 (2018) 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.10.007>.
- [127] D.A. Anderson, K.M. Murphy, C.G. Briseño, Development, diversity, and function of dendritic cells in mouse and human, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 10 (2018) a028613. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028613>.
- [128] M.B. Lodoen, L.L. Lanier, Natural killer cells as an initial defense against pathogens, *Curr. Opin. Immunol.* 18 (2006) 391–398. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2006.05.002>.
- [129] J. Li, S.K. Figueira, A.C.A. Vrazo, B.F. Binkowski, B.L. Butler, Y. Tabata, A. Filipovich, M.B. Jordan, K.A. Risma, Real-Time Detection of CTL Function Reveals Distinct Patterns of Caspase Activation Mediated by Fas versus Granzyme B, *J. Immunol.* 193 (2014) 519–528. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301668>.
- [130] N.A. Thornberry, T.A. Rano, E.P. Peterson, D.M. Rasper, T. Timkey, M. Garcia-Calvo, V.M. Houtzager, P.A. Nordstrom, S. Roy, J.P. Vaillancourt, K.T. Chapman, D.W. Nicholson, A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B: Functional relationships established for key mediators of apoptosis, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 17907–17911. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.29.17907>.
- [131] R.H.P. Law, N. Lukoyanova, I. Voskoboinik, T.T. Caradoc-Davies, K. Baran, M.A. Dunstone, M.E. D’Angelo, E. V. Orlova, F. Coulibaly, S. Verschoor, K.A. Browne, A.

- Ciccione, M.J. Kuiper, P.I. Bird, J.A. Trapani, H.R. Saibil, J.C. Whisstock, The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin, *Nature*. 468 (2010) 447–451. <https://doi.org/10.1038/nature09518>.
- [132] R.A. Seder, W.E. Paul, Acquisition of Lymphokine-Producing Phenotype by CD4+ T Cells, *Annu. Rev. Immunol.* 12 (1994) 635–673. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.003223>.
- [133] S.L. Swain, K.K. McKinstry, T.M. Strutt, Expanding roles for CD4 + T cells in immunity to viruses, *Nat. Rev. Immunol.* 12 (2012) 136–148. <https://doi.org/10.1038/nri3152>.
- [134] S.K. Oh, L.P. Perera, M. Terabe, L. Ni, T.A. Waldmann, J.A. Berzofsky, IL-15 as a mediator of CD4+ help for CD8+ T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 5201–5206. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801003105>.
- [135] T. Inoue, I. Moran, R. Shinnakasu, T.G. Phan, T. Kurosaki, Generation of memory B cells and their reactivation, *Immunol. Rev.* 283 (2018) 138–149. <https://doi.org/10.1111/IMR.12640>.
- [136] C.G. Vinuesa, M.A. Linterman, D. Yu, I.C.M. MacLennan, Follicular Helper T Cells, *Annu. Rev. Immunol.* 34 (2016) 335–368. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-041015-055605>.
- [137] L. Petersone, N.M. Edner, V. Ovcinnikovs, F. Heuts, E.M. Ross, E. Ntavli, C.J. Wang, L.S.K. Walker, T Cell/B Cell Collaboration and Autoimmunity: An Intimate Relationship, *Front. Immunol.* 9 (2018) 1941. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01941>.
- [138] R.M. Welsh, K. Bahl, H.D. Marshall, S.L. Urban, Type 1 interferons and antiviral CD8 T-Cell responses, *PLoS Pathog.* 8 (2012) e1002352. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002352>.
- [139] G.A. Kolumam, S. Thomas, L.J. Thompson, J. Sprent, K. Murali-Krishna, Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection, *J. Exp. Med.* 202 (2005) 637–650.

<https://doi.org/10.1084/jem.20050821>.

- [140] L.M. Snell, T.L. McGaha, D.G. Brooks, Type I Interferon in Chronic Virus Infection and Cancer, *Trends Immunol.* 38 (2017) 542–557. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.05.005>.
- [141] W.E. Purtha, K.A. Chachu, H.W. Virgin, M.S. Diamond, Early B-Cell Activation after West Nile Virus Infection Requires Alpha/Beta Interferon but Not Antigen Receptor Signaling, *J. Virol.* 82 (2008) 10964–10974. <https://doi.org/10.1128/jvi.01646-08>.
- [142] M. Kopf, F. Brombacher, M.F. Bachmann, Role of IgM antibodies versus B cells in influenza virus-specific immunity, *Eur. J. Immunol.* 32 (2002) 2229–2236. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200208\)32:8<2229::AID-IMMU2229>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200208)32:8<2229::AID-IMMU2229>3.0.CO;2-T).
- [143] J.H. Lam, N. Baumgarth, The Multifaceted B Cell Response to Influenza Virus, *J. Immunol.* 202 (2019) 351–359. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801208>.
- [144] H.W. Schroeder, L. Cavacini, Structure and function of immunoglobulins, *J. Allergy Clin. Immunol.* 125 (2010) S41. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>.
- [145] M.F. Sante Tura, Michele Bacarani, Eliana Zuffa, Domenico Russo, Renato Fanin, Alfonso Zaccaria, Interferon alfa-2a as compared with conventional chemotherapy for the treatment of chronic myeloid leukemia, *N. Engl. J. Med.* 330 (1994) 820–825. <https://doi.org/10.1056/NEJM199403243301204>.
- [146] J.J. Hooks, H.M. Moutsopoulos, S.A. Geis, N.I. Stahl, J.L. Decker, A.L. Notkins, Immune Interferon in the Circulation of Patients with Autoimmune Disease, *N. Engl. J. Med.* 301 (1979) 5–8. <https://doi.org/10.1056/NEJM197907053010102>.
- [147] P. Blanco, A.K. Palucka, M. Gill, V. Pascual, J. Banchereau, Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus, *Science* (80-.). 294 (2001) 1540–1543. <https://doi.org/10.1126/science.1064890>.
- [148] M. Schwabenland, O. Mossad, A.G. Peres, F. Kessler, F.J.M. Maron, L.A. Harsan, T. Bienert, D. von Elverfeldt, K.P. Knobloch, O. Staszewski, F.L. Heppner, M.E.C.

- Meuwissen, G.M.S. Mancini, M. Prinz, T. Blank, Loss of USP18 in microglia induces white matter pathology, *Acta Neuropathol. Commun.* 7 (2019) 106. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0757-8>.
- [149] M.E.C. Meuwissen, R. Schot, S. Buta, G. Oudesluijs, S. Tinschert, S.D. Speer, Z. Li, L. van Unen, D. Heijnsman, T. Goldmann, M.H. Lequin, J.M. Kros, W. Stam, M. Hermann, R. Willemsen, R.W.W. Brouwer, W.F.J. Van IJcken, M. Martin-Fernandez, I. de Coo, J. Dudink, F.A.T. de Vries, A.B. Avella, M. Prinz, Y.J. Crow, F.W. Verheijen, S. Pellegrini, D. Bogunovic, G.M.S. Mancini, Human USP18 deficiency underlies type 1 interferonopathy leading to severe pseudo-TORCH syndrome, *J. Exp. Med.* 213 (2016) 1163–1174. <https://doi.org/10.1084/jem.20151529>.
- [150] C. Achard, N. Boisgerault, T. Delaunay, D. Roulois, S. Nedellec, P.J. Royer, M. Pain, C. Combredet, M. Mesel-Lemoine, L. Cellerin, A. Magnan, F. Tangy, M. Grégoire, J.F. Fonteneau, Sensitivity of human pleural mesothelioma to oncolytic measles virus depends on defects of the type I interferon response, *Oncotarget.* 6 (2015) 44892–44904. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6285>.
- [151] T. Delaunay, C. Achard, N. Boisgerault, M. Grard, T. Petithomme, C. Chatelain, S. Dutoit, C. Blanquart, P.J. Royer, S. Minvielle, L. Quetel, C. Meiller, D. Jean, D. Fradin, J. Bennouna, A. Magnan, L. Cellerin, F. Tangy, M. Grégoire, J.F. Fonteneau, Frequent Homozygous Deletions of Type I Interferon Genes in Pleural Mesothelioma Confer Sensitivity to Oncolytic Measles Virus, *J. Thorac. Oncol.* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.12.128>.
- [152] D.F. Stojdl, B. Lichty, S. Knowles, R. Marius, H. Atkins, N. Sonenberg, J.C. Bell, Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus, *Nat. Med.* 6 (2000) 821–825. <https://doi.org/10.1038/77558>.
- [153] W.H. Sun, C. Pabon, Y. Alsayed, P.P. Huang, S. Jandeska, S. Uddin, L.C. Plataniias, S.T. Rosen, Interferon- α Resistance in a Cutaneous T-Cell Lymphoma Cell Line Is Associated With Lack of STAT1 Expression, *Blood.* 91 (1998) 570–576. <https://doi.org/10.1182/blood.v91.2.570>.

- [154] L.H. Wong, K.G. Krauer, I. Hatzinisiiriou, M.J. Estcourt, P. Hersey, N.D. Tam, S. Edmondson, R.J. Devenish, S.J. Ralph, Interferon-resistant human melanoma cells are deficient in ISGF3 components, STAT1, STAT2, and p48-ISGF3 γ , *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 28779–28785. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.45.28779>.
- [155] R.J. Poljak, L.M. Amzel, H.P. Avey, B.L. Chen, R.P. Phizackerley, F. Saul, Three dimensional structure of the Fab' fragment of a human immunoglobulin at 2.8 Å resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70 (1973) 3305–3310. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.12.3305>.
- [156] M.L. Chiu, D.R. Goulet, A. Teplyakov, G.L. Gilliland, Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics, *Antibodies*. 8 (2019) 55. <https://doi.org/10.3390/antib8040055>.
- [157] L.C. Antón, S. Ruiz, E. Barrio, G. Marqués, A. Sánchez, F. Vivanco, C3 binds with similar efficiency to Fab and Fc regions of IgG immune aggregates, *Eur. J. Immunol.* 24 (1994) 599–604. <https://doi.org/10.1002/eji.1830240316>.
- [158] B. Peschke, C.W. Keller, P. Weber, I. Quast, J.D. Lünemann, Fc-galactosylation of human immunoglobulin gamma isotypes improves C1q binding and enhances complement-dependent cytotoxicity, *Front. Immunol.* 8 (2017). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00646>.
- [159] A. Nisonoff, F.C. Wissler, L.N. Lipman, Properties of the major component of a peptic digest of rabbit antibody, *Science* (80-.). 132 (1960) 1770–1771. <https://doi.org/10.1126/science.132.3441.1770>.
- [160] U. Brinkmann, R.E. Kontermann, The making of bispecific antibodies, *MAbs*. 9 (2017) 182–212. <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1268307>.
- [161] A.F. Labrijn, M.L. Janmaat, J.M. Reichert, P.W.H.I. Parren, Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline, *Nat. Rev. Drug Discov.* 18 (2019) 585–608. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0028-1>.
- [162] J. Schuurman, R. Van Ree, G.J. Perdok, H.R. Van Doorn, K.Y. Tan, R.C. Aalberse, Normal human immunoglobulin G4 is bispecific: It has two different antigen-combining sites, *Immunology*. 97 (1999) 693–698.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1999.00845.x>.

- [163] A. Löffler, M. Gruen, C. Wuchter, F. Schriever, P. Kufer, T. Dreier, F. Hanakam, P.A. Baeuerle, K. Bommert, L. Karawajew, B. Dörken, R.C. Bargou, Efficient elimination of chronic lymphocytic leukaemia B cells by autologous T cells with a bispecific anti-CD19/anti-CD3 single-chain antibody construct, *Leukemia*. 17 (2003) 900–909. <https://doi.org/10.1038/SJ.LEU.2402890>.
- [164] M.E. Goebeler, R. Bargou, Blinatumomab: a CD19/CD3 bispecific T cell engager (BiTE) with unique anti-tumor efficacy, *Leuk. Lymphoma*. 57 (2016) 1021–1032. <https://doi.org/10.3109/10428194.2016.1161185>.
- [165] H. Kantarjian, A. Stein, N. Gökbuget, A.K. Fielding, A.C. Schuh, J.-M. Ribera, A. Wei, H. Dombret, R. Foà, R. Bassan, Ö. Arslan, M.A. Sanz, J. Bergeron, F. Demirkan, E. Lech-Maranda, A. Rambaldi, X. Thomas, H.-A. Horst, M. Brüggemann, W. Klapper, B.L. Wood, A. Fleishman, D. Nagorsen, C. Holland, Z. Zimmerman, M.S. Topp, Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia, *N. Engl. J. Med.* 376 (2017) 836–847. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1609783>.
- [166] Z. Li, B.F. Krippendorff, S. Sharma, A.C. Walz, T. Lavé, D.K. Shah, Influence of molecular size on tissue distribution of antibody fragments, *MAbs*. 8 (2016) 113–119. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1111497>.
- [167] C. Hamers-Casterman, T. Atarhouch, S. Muyldermans, G. Robinson, C. Hammers, E.B. Songa, N. Bendahman, R. Hammers, Naturally occurring antibodies devoid of light chains, 1993. <https://doi.org/10.1038/363446a0>.
- [168] S. Muyldermans, Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies, *Annu. Rev. Biochem.* 82 (2013) 775–797. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>.
- [169] P. Debie, C. Lafont, M. Defrise, I. Hansen, D.M. van Willigen, F.W.B. van Leeuwen, R. Gijssbers, M. D’Huyvetter, N. Devoogdt, T. Lahoutte, P. Mollard, S. Hernot, Size and affinity kinetics of nanobodies influence targeting and penetration of solid tumours, *J. Control. Release.* 317 (2020) 34–42.

<https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2019.11.014>.

- [170] M. Schlapschy, U. Binder, C. Börger, I. Theobald, K. Wachinger, S. Kisling, D. Haller, A. Skerra, PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins, *Protein Eng. Des. Sel.* 26 (2013) 489. <https://doi.org/10.1093/PROTEIN/GZT023>.
- [171] K.B. Vu, M.A. Ghahroudi, L. Wyns, S. Muyldermans, Comparison of llama V(H) sequences from conventional and heavy chain antibodies, *Mol. Immunol.* 34 (1997) 1121–1131. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(97\)00146-6](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(97)00146-6).
- [172] M.M. Harmsen, R.C. Ruuls, I.J. Nijman, T.A. Niewold, L.G.J. Frenken, B. De Geus, Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(00\)00081-X](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(00)00081-X).
- [173] R.C. Roovers, M.J.W.D. Vosjan, T. Laeremans, R. El Khoulati, R.C.G. De Bruin, K.M. Ferguson, A.J. Verkleij, G.A.M.S. Van Dongen, P.M.P. Van Bergen En Henegouwen, A biparatopic anti-EGFR nanobody efficiently inhibits solid tumour growth, *Int. J. Cancer.* 129 (2011) 2013–2024. <https://doi.org/10.1002/ijc.26145>.
- [174] R.C. Roovers, T. Laeremans, L. Huang, S. De Taeye, A.J. Verkleij, H. Revets, H.J. De Haard, P.M.P. Van Bergen En Henegouwen, Efficient inhibition of EGFR signalling and of tumour growth by antagonistic anti-EGFR Nanobodies, *Cancer Immunol. Immunother.* 56 (2007) 303–317. <https://doi.org/10.1007/s00262-006-0180-4>.
- [175] Y. Hu, C. Liu, S. Muyldermans, Nanobody-based delivery systems for diagnosis and targeted tumor therapy, *Frontiers Media S.A.*, 2017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01442>.
- [176] M. Kijanka, B. Dorresteyn, S. Oliveira, P.M.P. Van Bergen En Henegouwen, Nanobody-based cancer therapy of solid tumors, *Nanomedicine.* 10 (2015) 161–174. <https://doi.org/10.2217/nnm.14.178>.
- [177] T. Schmidt Slørdahl, T. Denayer, S. Helen Moen, T. Standal, M. Børset, C. Ververken, T. Baade Rø, Anti-c-MET Nanobody® - A new potential drug in multiple myeloma treatment, *Eur. J. Haematol.* 91 (2013) 399–410. <https://doi.org/10.1111/ejh.12185>.

- [178] A.W. Woodham, R.W. Cheloha, J. Ling, M. Rashidian, S.C. Kolifrath, M. Mesyngier, J.N. Duarte, J.M. Bader, J.G. Skeate, D.M. Da Silva, W. Martin Kast, H.L. Ploegh, Nanobody–antigen conjugates elicit HPV-specific antitumor immune responses, *Cancer Immunol. Res.* 6 (2018) 870–880. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-17-0661>.
- [179] I. Altintas, R. Heukers, R. Van Der Meel, M. Lacombe, M. Amidi, P.M.P. Van Bergen En Henegouwen, W.E. Hennink, R.M. Schiffelers, R.J. Kok, Nanobody-albumin nanoparticles (NANAPs) for the delivery of a multikinase inhibitor 17864 to EGFR overexpressing tumor cells, *J. Control. Release.* 165 (2013) 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.11.007>.
- [180] L. Huang, L.O.T. Gainkam, V. Caveliers, C. Vanhove, M. Keyaerts, P. Baetselier, A. Bossuyt, H. Revets, T. Lahoutte, SPECT imaging with ^{99m}Tc-labeled EGFR-specific nanobody for in vivo monitoring of EGFR expression, *Mol. Imaging Biol.* 10 (2008) 167–175. <https://doi.org/10.1007/s11307-008-0133-8>.
- [181] M. D’Huyvetter, A. Aerts, C. Xavier, I. Vaneycken, N. Devoogdt, M. Gijs, N. Impens, S. Baatout, B. Ponsard, S. Muyltermans, V. Caveliers, T. Lahoutte, Development of ¹⁷⁷Lu-nanobodies for radioimmunotherapy of HER2-positive breast cancer: Evaluation of different bifunctional chelators, *Contrast Media Mol. Imaging.* 7 (2012) 254–264. <https://doi.org/10.1002/cmml.491>.
- [182] P. Hu, J.L. Hornick, M.S. Glasky, A. Yun, M.N. Milkie, L.A. Khawli, P.M. Anderson, A.L. Epstein, A chimeric Lym-1/interleukin 2 fusion protein for increasing tumor vascular permeability and enhancing antibody uptake, *Cancer Res.* 56 (1996) 4998–5004.
- [183] H.N. Lode, R. Xiang, J.C. Becker, S.D. Gillies, R.A. Reisfeld, Immunocytokines: A Promising Approach to Cancer Immunotherapy, *Pharmacol. Ther.* 80 (1998) 277–292.
- [184] H. Sabzevari, S.D. Gillies, B.M. Mueller, J.D. Pancook, R.A. Reisfeld, A recombinant antibody-interleukin 2 fusion protein suppresses growth of hepatic human neuroblastoma metastases in severe combined immunodeficiency mice (cytokine fusion protein/hepatic metastases), 1994.

- [185] A. Cauwels, S. Van Lint, G. Garcin, J. Bultinck, F. Paul, S. Gerlo, J. Van der Heyden, Y. Bordat, D. Catteuw, L. De Cauwer, E. Rogge, A. Verhee, G. Uzé, J. Tavernier, A safe and highly efficient tumor-targeted type I interferon immunotherapy depends on the tumor microenvironment, *Oncoimmunology*. 7 (2017). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1398876>.
- [186] G.P. Smith, Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface, *Science* (80-.). 228 (1985) 1315–1317. <https://doi.org/10.1126/science.4001944>.
- [187] J. McCafferty, A.D. Griffiths, G. Winter, D.J. Chiswell, Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains, *Nat.* 1990 3486301. 348 (1990) 552–554. <https://doi.org/10.1038/348552A0>.
- [188] L. Ledsgaard, M. Kilstrup, A. Karatt-Vellatt, J. McCafferty, A.H. Laustsen, Basics of antibody phage display technology, *Toxins* (Basel). 10 (2018). <https://doi.org/10.3390/toxins10060236>.
- [189] K. Morrissey, T. Yuraszek, C.C. Li, Y. Zhang, S. Kasichayanula, Immunotherapy and Novel Combinations in Oncology: Current Landscape, Challenges, and Opportunities, *Clin. Transl. Sci.* 9 (2016) 89–104. <https://doi.org/10.1111/cts.12391>.
- [190] H. Fukuhara, Y. Ino, T. Todo, Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn, *Cancer Sci.* 107 (2016) 1373–1379. <https://doi.org/10.1111/cas.13027>.
- [191] E. Kelly, S.J. Russell, History of Oncolytic Viruses: Genesis to Genetic Engineering, *Mol. Ther.* 15 (2007) 651–659. <https://doi.org/10.1038/mt.sj.6300108>.
- [192] W.B. Coley, The treatment of malignant tumors by inoculations of erysipelas, *J. Am. Med. Assoc.* 105 (1893) 615–616. <https://doi.org/10.1001/jama.1893.02420490019007>.
- [193] N. De Pace, Rabies virus treatment of cervical cancer, *Ginecologia*. 9 (1912) 82.
- [194] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: The next generation, *Cell*. 144

- (2011) 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- [195] J. Fonteneau, É. Quemeneur, An Emerging Strategy for Cancer Treatment, *Immunité et Cancer*. 3 (2019) 1–12.
- [196] M. Hallek, L. Wanders, S. Strohmeyer, B. Emmerich, Thymidine kinase: a tumor marker with prognostic value for non-Hodgkin's lymphoma and a broad range of potential clinical applications, *Ann. Hematol.* 65 (1992) 1–5. <https://doi.org/10.1007/BF01715117>.
- [197] L. Hanousková, J. Řezáč, Š. Veselý, R. Průša, K. Kotaška, Thymidine Kinase-1 as Additional Diagnostic Marker of Prostate Cancer, *Clin. Lab.* 66 (2020) 1045–1049. <https://doi.org/10.7754/CLIN.LAB.2019.191026>.
- [198] L. Fend, C. Remy-Ziller, J. Foloppe, J. Kempf, S. Cochin, L. Barraud, N. Accart, P. Erbs, S. Fournel, X. Prévile, Oncolytic virotherapy with an armed vaccinia virus in an orthotopic model of renal carcinoma is associated with modification of the tumor microenvironment, *Oncoimmunology*. 5 (2015). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1080414>.
- [199] W.H. Ip, T. Dobner, Cell transformation by the adenovirus oncogenes E1 and E4, *FEBS Lett.* 594 (2020) 1848–1860. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13717>.
- [200] J.W. Lillie, P.M. Loewenstein, M.R. Green, M. Green, Functional domains of adenovirus type 5 E1a proteins, *Cell*. 50 (1987) 1091–1100. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90175-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90175-9).
- [201] J. Fueyo, R. Alemany, C. Gomez-Manzano, G.N. Fuller, A. Khan, C.A. Conrad, T.J. Liu, H. Jiang, M.G. Lemoine, K. Suzuki, R. Sawaya, D.T. Curiel, W.K.A. Yung, F.F. Lang, Preclinical characterization of the antiglioma activity of a tropism-enhanced adenovirus targeted to the retinoblastoma pathway, *J. Natl. Cancer Inst.* 95 (2003) 652–660. <https://doi.org/10.1093/JNCI/95.9.652>.
- [202] K.H. Vousden, X. Lu, Live or let die: The cell's response to p53, *Nat. Rev. Cancer*. 2 (2002) 594–604. <https://doi.org/10.1038/nrc864>.
- [203] K. Garber, China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer

- treatment., J. Natl. Cancer Inst. 98 (2006) 298–300.
<https://doi.org/10.1093/jnci/djj111>.
- [204] M.D. Trottier, B.M. Palian, C. Shoshkes Reiss, VSV replication in neurons is inhibited by type I IFN at multiple stages of infection, *Virology*. 333 (2005) 215–225. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2005.01.009>.
- [205] Y. Kim, J. Park, S. Kim, M.A. Kim, M.G. Kang, C. Kwak, M. Kang, B. Kim, H.W. Rhee, V.N. Kim, PKR Senses Nuclear and Mitochondrial Signals by Interacting with Endogenous Double-Stranded RNAs, *Mol. Cell*. 71 (2018) 1051-1063.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.07.029>.
- [206] B. He, M. Gross, B. Roizman, The γ 134.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1 α to dephosphorylate the α subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 843–848. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.3.843>.
- [207] B.L. Liu, M. Robinson, Z.Q. Han, R.H. Branston, C. English, P. Reay, Y. McGrath, S.K. Thomas, M. Thornton, P. Bullock, C.A. Love, R.S. Coffin, ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties, *Gene Ther.* 10 (2003) 292–303. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301885>.
- [208] B.L. Black, D.S. Lyles, Vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits host cell-directed transcription of target genes in vivo., *J. Virol.* 66 (1992) 4058–4064. <https://doi.org/10.1128/jvi.66.7.4058-4064.1992>.
- [209] D. Blondel, G.G. Harmison, M. Schubert, Role of matrix protein in cytopathogenesis of vesicular stomatitis virus., *J. Virol.* 64 (1990) 1716–1725. <https://doi.org/10.1128/jvi.64.4.1716-1725.1990>.
- [210] D.F. Stojdl, N. Abraham, S. Knowles, R. Marius, A. Brasey, B.D. Lichty, E.G. Brown, N. Sonenberg, J.C. Bell, The Murine Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase PKR Is Required for Resistance to Vesicular Stomatitis Virus, *J. Virol.* 74 (2000) 9580–9585. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.20.9580-9585.2000>.

- [211] F. Allagui, C. Achard, C. Panterne, C. Combredet, N. Labarrière, B. Dréno, A. Elgaaied, D. Pouliquen, F. Tangy, J.-F. Fonteneau, M. Grégoire, N. Boisgerault, Modulation of the Type I Interferon Response Defines the Sensitivity of Human Melanoma Cells to Oncolytic Measles Virus, *Curr. Gene Ther.* 16 (2017) 419–428. <https://doi.org/10.2174/1566523217666170102110502>.
- [212] C. Kurokawa, I.D. Iankov, S.K. Anderson, I. Aderca, A.A. Leontovich, M.J. Maurer, A.L. Oberg, M.A. Schroeder, C. Giannini, S.M. Greiner, M.A. Becker, E.A. Thompson, P. Haluska, M.E. Jentoft, I.F. Parney, S.J. Weroha, J. Jen, J.N. Sarkaria, E. Galanis, Constitutive interferon pathway activation in tumors as an efficacy determinant following oncolytic virotherapy, *J. Natl. Cancer Inst.* 110 (2018). <https://doi.org/10.1093/jnci/djy033>.
- [213] M. Aghi, R.L. Martuza, Oncolytic viral therapies - The clinical experience, *Oncogene.* 24 (2005) 7802–7816. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209037>.
- [214] R.H.I. Andtbacka, H.L. Kaufman, F. Collichio, T. Amatruda, N. Senzer, J. Chesney, K.A. Delman, L.E. Spitler, I. Puzanov, S.S. Agarwala, M. Milhem, L. Cranmer, B. Curti, K. Lewis, M. Ross, T. Guthrie, G.P. Linette, G.A. Daniels, K. Harrington, M.R. Middleton, W.H. Miller, J.S. Zager, Y. Ye, B. Yao, A. Li, S. Doleman, A. Van Der Walde, J. Gansert, R.S. Coffin, Talimogene laherparepvec improves durable response rate in patients with advanced melanoma, *J. Clin. Oncol.* 33 (2015) 2780–2788. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.3377>.
- [215] K.J. Harrington, I. Puzanov, J.R. Hecht, F.S. Hodi, Z. Szabo, S. Murugappan, H.L. Kaufman, Clinical development of talimogene laherparepvec (T-VEC): a modified herpes simplex virus type-1–derived oncolytic immunotherapy, *Expert Rev. Anticancer Ther.* 15 (2015) 1389–1403. <https://doi.org/10.1586/14737140.2015.1115725>.
- [216] N.M. Durham, K. Mulgrew, K. McGlinchey, N.R. Monks, H. Ji, R. Herbst, J.A. Suzich, S.A. Hammond, E.J. Kelly, Oncolytic VSV Primes Differential Responses to Immuno-oncology Therapy, *Mol. Ther.* 25 (2017) 1917–1932. <https://doi.org/10.1016/J.YMTHE.2017.05.006/ATTACHMENT/1D0E7C4E-5269-4A89-8AE1-AF433FD2AC13/MMC1.PDF>.

- [217] M.R. Patel, B.A. Jacobson, Y. Ji, J. Drees, S. Tang, K. Xiong, H. Wang, J.E. Prigge, A.S. Dash, A.K. Kratzke, E. Mesev, R. Etchison, M.J. Federspiel, S.J. Russell, R.A. Kratzke, Vesicular stomatitis virus expressing interferon- β is oncolytic and promotes antitumor immune responses in a syngeneic murine model of non-small cell lung cancer, *Oncotarget*. 6 (2015) 33165. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.5320>.
- [218] R. Veinalde, G. Pidelaserra-Martí, C. Moulin, L.M. Jeworowski, L. Küther, C.J. Buchholz, D. Jäger, G. Ungerechts, C.E. Engeland, Oncolytic measles vaccines encoding PD-1 and PD-L1 checkpoint blocking antibodies to increase tumor-specific T cell memory, *Mol. Ther. Oncolytics*. 24 (2021) 43–58. <https://doi.org/10.1016/J.OMTO.2021.11.020>.
- [219] B. Xu, L. Tian, J. Chen, J. Wang, R. Ma, W. Dong, A. Li, J. Zhang, E. Antonio Chiocca, B. Kaur, M. Feng, M.A. Caligiuri, J. Yu, An oncolytic virus expressing a full-length antibody enhances antitumor innate immune response to glioblastoma, *Nat. Commun.* 12 (2021). <https://doi.org/10.1038/S41467-021-26003-6>.
- [220] J.F. de Graaf, L. de Vor, R.A.M. Fouchier, B.G. van den Hoogen, Armed oncolytic viruses: A kick-start for anti-tumor immunity, *Cytokine Growth Factor Rev.* 41 (2018) 28. <https://doi.org/10.1016/J.CYTOGFR.2018.03.006>.
- [221] J.B. Guillerme, M. Gregoire, F. Tangy, J.F. Fonteneau, Antitumor virotherapy by attenuated measles virus (MV, *Biology (Basel)*. 2 (2013) 587–602. <https://doi.org/10.3390/biology2020587>.
- [222] A. Gauvrit, S. Brandler, C. Sapede-Peroz, N. Boisgerault, F. Tangy, M. Gregoire, Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response, *Cancer Res.* 68 (2008) 4882–4892. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6265>.
- [223] J.F. de Graaf, L. de Vor, R.A.M. Fouchier, B.G. van den Hoogen, Armed oncolytic viruses: A kick-start for anti-tumor immunity, *Cytokine Growth Factor Rev.* 41 (2018) 28–39. <https://doi.org/10.1016/J.CYTOGFR.2018.03.006>.
- [224] P.S. Backhaus, R. Veinalde, L. Hartmann, J.E. Dunder, L.M. Jeworowski, J. Albert,

- B. Hoyler, T. Poth, D. Jäger, G. Ungerechts, C.E. Engeland, Immunological Effects and Viral Gene Expression Determine the Efficacy of Oncolytic Measles Vaccines Encoding IL-12 or IL-15 Agonists, *Viruses* 2019, Vol. 11, Page 914. 11 (2019) 914. <https://doi.org/10.3390/V11100914>.
- [225] C. Dold, C. Rodriguez Urbiola, G. Wollmann, L. Egerer, A. Muik, L. Bellmann, H. Fiegl, C. Marth, J. Kimpel, D. von Laer, Application of interferon modulators to overcome partial resistance of human ovarian cancers to VSV-GP oncolytic viral therapy, *Mol. Ther. - Oncolytics*. 3 (2016) 16021. <https://doi.org/10.1038/MTO.2016.21>.
- [226] M.R. Patel, A. Dash, B.A. Jacobson, Y. Ji, D. Baumann, K. Ismail, R.A. Kratzke, JAK/STAT inhibition with ruxolitinib enhances oncolytic virotherapy in non-small cell lung cancer models, *Cancer Gene Ther.* 26 (2019) 411–418. <https://doi.org/10.1038/s41417-018-0074-6>.
- [227] C.E. Stewart, R.E. Randall, C.S. Adamson, Inhibitors of the Interferon Response Enhance Virus Replication In Vitro, *PLoS One*. 9 (2014) e112014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112014>.
- [228] L. Fend, T. Yamazaki, C. Remy, C. Fahrner, M. Gantzer, V. Nourtier, X. Prévaille, E. Quéméneur, O. Kepp, J. Adam, A. Marabelle, J.M. Pitt, G. Kroemer, L. Zitvogel, Immune Checkpoint Blockade, Immunogenic Chemotherapy or IFN- α Blockade Boost the Local and Abscopal Effects of Oncolytic Virotherapy, *Cancer Res.* 77 (2017) 4146–4157. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2165>.
- [229] U. Müller, U. Steinhoff, L.F.L. Reis, S. Hemmi, J. Pavlovic, R.M. Zinkernagel, M. Aguet, Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense, *Science* (80-.). 264 (1994) 1918–1921. <https://doi.org/10.1126/science.8009221>.
- [230] V. Fensterl, J.L. Wetzel, S. Ramachandran, T. Ogino, S.A. Stohlman, C.C. Bergmann, M.S. Diamond, H.W. Virgin, G.C. Sen, Interferon-induced Ifit2/ISG54 protects mice from lethal VSV neuropathogenesis, *PLoS Pathog.* 8 (2012). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002712>.
- [231] C.N. Detje, T. Meyer, H. Schmidt, D. Kreuz, J.K. Rose, I. Bechmann, M. Prinz, U.

- Kalinke, Local Type I IFN Receptor Signaling Protects against Virus Spread within the Central Nervous System, *J. Immunol.* 182 (2009) 2297–2304. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0800596>.
- [232] W. Koestner, J. Spanier, T. Klause, P.-K. Tegtmeyer, J. Becker, V. Herder, K. Borst, D. Todt, S. Lienenklaus, I. Gerhauser, C.N. Detje, R. Geffers, M.A. Langereis, F.W.R. Vondran, Q. Yuan, F.J.M. van Kuppeveld, M. Ott, P. Staeheli, E. Steinmann, W. Baumgärtner, F. Wacker, U. Kalinke, Interferon-beta expression and type I interferon receptor signaling of hepatocytes prevent hepatic necrosis and virus dissemination in Coxsackievirus B3-infected mice, *PLOS Pathog.* 14 (2018) e1007235. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007235>.
- [233] C.J.A. Duncan, R.E. Randall, S. Hambleton, Genetic Lesions of Type I Interferon Signalling in Human Antiviral Immunity, *Trends Genet.* 37 (2021) 46–58. <https://doi.org/10.1016/J.TIG.2020.08.017>.
- [234] C.J.A. Duncan, S.M. Mohamad, D.F. Young, A.J. Skelton, T.R. Leahy, D.C. Munday, K.M. Butler, S. Morfopoulou, J.R. Brown, M. Hubank, J. Connell, P.J. Gavin, C. McMahon, E. Dempsey, N.E. Lynch, T.S. Jacques, M. Valappil, A.J. Cant, J. Breuer, K.R. Engelhardt, R.E. Randall, S. Hambleton, Human IFNAR2 deficiency: lessons for antiviral immunity, *Sci. Transl. Med.* 7 (2015) 307ra154. <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.AAC4227>.
- [235] N. Hernandez, G. Bucciol, L. Moens, J. Le Pen, M. Shahrooei, E. Goudouris, A. Shirkani, M. Changi-Ashtiani, H. Rokni-Zadeh, E.H. Sayar, I. Reisli, A. Lefevre-Utile, D. Zijlmans, A. Jurado, R. Pholien, S. Drutman, S. Belkaya, A. Cobat, R. Boudewijns, D. Jochmans, J. Neyts, Y. Seeleuthner, L. Lorenzo-Diaz, C. Enemchukwu, I. Tietjen, H.-H. Hoffmann, M. Momenilandi, L. Pöyhönen, M.M. Siqueira, S.M.B. de Lima, D.C. de S. Matos, A. Homma, M. de L.S. Maia, T.A. da C. Barros, P.M.N. de Oliveira, E.C. Mesquita, R. Gijssbers, S.-Y. Zhang, S.J. Seligman, L. Abel, P. Hertzog, N. Marr, R. de M. Martins, I. Meyts, Q. Zhang, M.R. MacDonald, C.M. Rice, J.-L. Casanova, E. Jouanguy, X. Bossuyt, Inherited IFNAR1 deficiency in otherwise healthy patients with adverse reaction to measles and yellow fever live vaccines, *J. Exp. Med.* 216 (2019) 2057. <https://doi.org/10.1084/JEM.20182295>.

- [236] G. Uzé, G. Lutfalla, P. Eid, C. Maury, M. -T M.-T. Bandu, I. Gresser, K. Mogensen, Murine tumor cells expressing the gene for the human interferon $\alpha\beta$ receptor elicit antibodies in syngeneic mice to the active form of the receptor, *Eur. J. Immunol.* 21 (1991) 447–451. <https://doi.org/10.1002/eji.1830210229>.
- [237] K.C.F. Sheehan, K.S. Lai, G.P. Dunn, A.T. Bruce, M.S. Diamond, J.D. Heutel, C. Dungo-Arthur, J.A. Carrero, J.M. White, P.J. Hertzog, R.D. Schreiber, Blocking monoclonal antibodies specific for mouse IFN- α/β receptor subunit 1 (IFNAR-1) from mice immunized by in vivo hydrodynamic transfection, *J. Interf. Cytokine Res.* 26 (2006) 804–819. <https://doi.org/10.1089/jir.2006.26.804>.
- [238] R. Baccala, R. Gonzalez-Quintial, R.D. Schreiber, B.R. Lawson, D.H. Kono, A.N. Theofilopoulos, Anti-IFN- α/β Receptor Antibody Treatment Ameliorates Disease in Lupus-Predisposed Mice, *J. Immunol.* 189 (2012) 5976–5984. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201477>.
- [239] J.M. Riggs, R.N. Hanna, B. Rajan, K. Zerrouki, J.L. Karnell, D. Sagar, I. Vainshtein, E. Farmer, K. Rosenthal, C. Morehouse, M. De Los Reyes, K. Schifferli, M. Liang, M.A. Sanjuan, G.P. Sims, R. Kolbeck, Characterisation of anifrolumab, a fully human anti-interferon receptor antagonist antibody for the treatment of systemic lupus erythematosus, *Lupus Sci. Med.* 5 (2018). <https://doi.org/10.1136/lupus-2018-000261>.
- [240] G.L. Plosker, Ruxolitinib: A review of its use in patients with myelofibrosis, *Drugs.* 75 (2015) 297–308. <https://doi.org/10.1007/s40265-015-0351-8>.
- [241] E. Sant'Antonio, M. Bonifacio, M. Breccia, E. Rumi, A journey through infectious risk associated with ruxolitinib, *Br. J. Haematol.* 187 (2019) 286–295. <https://doi.org/10.1111/bjh.16174>.
- [242] K. Schönberg, J. Rudolph, M. Vonnahme, S.P. Yajnanarayana, I. Cornez, M. Hejazi, A.R. Manser, M. Uhrberg, W. Verbeek, S. Koschmieder, T.H. Brümmendorf, P. Brossart, A. Heine, D. Wolf, JAK inhibition impairs NK cell function in myeloproliferative neoplasms, *Cancer Res.* 75 (2015) 2187–2199. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3198>.

- [243] G. Garcin, F. Paul, M. Staufenbiel, Y. Bordat, J. Van der Heyden, S. Wilmes, G. Cartron, F. Apparailly, S. De Koker, J. Piehler, J. Tavernier, G. Uzé, High efficiency cell-specific targeting of cytokine activity, *Nat. Commun.* 5 (2014) 3016. <https://doi.org/10.1038/ncomms4016>.
- [244] A. Cauwels, S. Van Lint, F. Paul, G. Garcin, S. De Koker, A. Van Parys, T. Wueest, S. Gerlo, J. Van der Heyden, Y. Bordat, D. Catteeuw, E. Rogge, A. Verhee, B. Vandekerckhove, N. Kley, G. Uze, J. Tavernier, Delivering type I interferon to dendritic cells empowers tumor eradication and immune combination treatments, *Cancer Res.* 78 (2018) 463–474. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1980>.
- [245] L. Zitvogel, L. Galluzzi, O. Kepp, M.J. Smyth, G. Kroemer, Type I interferons in anticancer immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 15 (2015) 405–414. <https://doi.org/10.1038/nri3845>.
- [246] A. Cauwels, S. Van Lint, D. Catteeuw, S. Pang, F. Paul, E. Rogge, A. Verhee, M. Prinz, N. Kley, G. Uzé, J. Tavernier, Targeting interferon activity to dendritic cells enables in vivo tolerization and protection against EAE in mice, *J. Autoimmun.* 97 (2019) 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2018.10.010>.
- [247] M. Moerdyk-Schauwecker, N.R. Shah, A.M. Murphy, E. Hastie, P. Mukherjee, V.Z. Grdzlishvili, Resistance of pancreatic cancer cells to oncolytic vesicular stomatitis virus: Role of type I interferon signaling, *Virology.* 436 (2013) 221–234. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2012.11.014>.
- [248] S.A. Gujar, P.W.K. Lee, Oncolytic virus-mediated reversal of impaired tumor antigen presentation, *Front. Oncol.* 4 APR (2014). <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00077>.
- [249] J. Pol, A. Buqué, F. Aranda, N. Bloy, I. Cremer, A. Eggermont, P. Erbs, J. Fucikova, J. Galon, J.-M. Limacher, X. Preville, C. Sautès-Fridman, R. Spisek, L. Zitvogel, G. Kroemer, L. Galluzzi, Trial Watch-Oncolytic viruses and cancer therapy, *Oncoimmunology.* 5 (2016) e1117740. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1117740>.

- [250] Z. Li, B.F. Krippendorff, D.K. Shah, Influence of molecular size on the clearance of antibody fragments, *Pharm. Res.* 34 (2017) 2131. <https://doi.org/10.1007/S11095-017-2219-Y>.
- [251] I. Jovčevska, S. Muyldermans, The Therapeutic Potential of Nanobodies, *BioDrugs.* 34 (2020) 11–26. <https://doi.org/10.1007/s40259-019-00392-z>.
- [252] N. Jilg, W. Lin, J. Hong, E.A. Schaefer, D. Wolski, J. Meixong, K. Goto, C. Brisac, P. Chusri, D.N. Fusco, S. Chevaliez, J. Luther, K. Kumthip, T.J. Urban, L.F. Peng, G.M. Lauer, R.T. Chung, Kinetic Differences in the Induction of Interferon Stimulated Genes by Interferon- α and IL28B are altered by Infection with Hepatitis C Virus, *Hepatology.* 59 (2014) 1250. <https://doi.org/10.1002/HEP.26653>.
- [253] S. Oliere, M. Arguello, T. Mesplede, V. Tumilasci, P. Nakhaei, D. Stojdl, N. Sonenberg, J. Bell, J. Hiscott, Vesicular Stomatitis Virus Oncolysis of T Lymphocytes Requires Cell Cycle Entry and Translation Initiation, *J. Virol.* 82 (2008) 5735–5749. <https://doi.org/10.1128/jvi.02601-07>.
- [254] H.C. Xu, R. Wang, P. V. Shinde, L. Walotka, A. Huang, G. Poschmann, J. Huang, W. Liu, K. Stühler, H. Schaal, A. Bergthaler, A.A. Pandya, C. Hardt, K.S. Lang, P.A. Lang, Slow viral propagation during initial phase of infection leads to viral persistence in mice, *Commun. Biol.* 4 (2021) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02028-x>.
- [255] D.F. Stojdl, B.D. Lichty, B.R. TenOever, J.M. Paterson, A.T. Power, S. Knowles, R. Marius, J. Reynard, L. Poliquin, H. Atkins, E.G. Brown, R.K. Durbin, J.E. Durbin, J. Hiscott, J.C. Bell, VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents, *Cancer Cell.* 4 (2003) 263–275. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00241-1](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00241-1).
- [256] S. Setrerrahmane, H. Xu, Tumor-related interleukins: Old validated targets for new anti-cancer drug development, *Mol. Cancer.* 16 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0721-9>.
- [257] L. Shangguan, X. Ti, U. Krause, B. Hai, Y. Zhao, Z. Yang, F. Liu, Inhibition of TGF- β /Smad Signaling by BAMBI Blocks Differentiation of Human Mesenchymal Stem

Cells to Carcinoma-Associated Fibroblasts and Abolishes their Protumor Effects, *Stem Cells*. 30 (2012) 2810–2819. <https://doi.org/10.1002/STEM.1251>.

- [258] E. Sahai, I. Astsaturov, E. Cukierman, D.G. DeNardo, M. Egeblad, R.M. Evans, D. Fearon, F.R. Greten, S.R. Hingorani, T. Hunter, R.O. Hynes, R.K. Jain, T. Janowitz, C. Jorgensen, A.C. Kimmelman, M.G. Kolonin, R.G. Maki, R.S. Powers, E. Puré, D.C. Ramirez, R. Scherz-Shouval, M.H. Sherman, S. Stewart, T.D. Tlsty, D.A. Tuveson, F.M. Watt, V. Weaver, A.T. Weeraratna, Z. Werb, A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts, *Nat. Rev. Cancer* 2020 203. 20 (2020) 174–186. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0238-1>.