



HAL
open science

Caractérisation des facteurs de résistance des cancers thoraciques au virus oncolytique de la rougeole en modèle 3D

Marion Grard

► **To cite this version:**

Marion Grard. Caractérisation des facteurs de résistance des cancers thoraciques au virus oncolytique de la rougeole en modèle 3D. Médecine humaine et pathologie. Nantes Université, 2023. Français. NNT : 2023NANU1008 . tel-04151056

HAL Id: tel-04151056

<https://theses.hal.science/tel-04151056>

Submitted on 4 Jul 2023

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.

THESE DE DOCTORAT

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie-Santé

Spécialité : « *Immunologie et Cancérologie* »

Par **Marion GRARD**

Caractérisation des facteurs de résistance du mésothéliome pleural malin au virus oncolytique de la rougeole en modèle 3D

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 15 mai 2023

Unité de recherche : INSERM UMR1307, CRCI²NA, Nantes

Rapporteurs avant soutenance :

Audrey Vincent
Mathieu Mateo

Chargée de recherche, UMR 9020 CNRS, 1277 INSERM, CANTHER
Chargé de recherche, Institut Pasteur, CIRI

Composition du Jury :

Examineurs : Karim Benihoud
Xavier Saulquin*
Claire Pecqueur

Professeur des universités, Université Paris-Saclay
Professeur des universités, CRCI²NA Nantes, UMR1307
Directrice de recherche, CRCI²NA Nantes, UMR1307

Dir. de thèse : Jean-François Fonteneau

Chargé de recherche, CRCI²NA Nantes, UMR1307

Invitée

Julie Tabiasco

Chargée de recherche, Institut Toulousain des Maladies Infectieuses et Inflammatoires, UMR1291

*Président de jury

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, la Dr. Audrey Vincent, le Dr. Mathieu Mateo, le Pr. Karim Benihoud, le Pr. Xavier Saulquin, la Dr. Claire Pecqueur d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Je remercie chaleureusement toute l'équipe 1 du CRCI²NA de m'avoir accueillie pendant ces 5 dernières années qui ont été pour moi enrichissantes et inoubliables. Je tiens à exprimer particulièrement à mes sincères remerciements à mon directeur de thèse, le Dr. Jean-François Fonteneau. Grâce à sa patience, sa bienveillance et son expertise, j'ai pu mener à bien ce projet de recherche et atteindre mes objectifs. Ses conseils avisés, ses encouragements et sa disponibilité ont été d'une aide précieuse pour moi.

Merci ensuite à tous nos collaborateurs qui ont rendu ces travaux possibles, Dr. Frédéric Tangy de l'Institut Pasteur à Paris, les plateformes Micropicell, Cytocell et Genobird ainsi que le département d'oncologie du CHU de Nantes.

Enfin, je tiens à remercier les membres de mon comité de thèse, le Pr. Yannick Guilloux et le Dr. David Roulois, qui ont suivi l'évolution de ma thèse pendant ces dernières années.

Merci infiniment à tous pour votre soutien et votre confiance.

SOMMAIRE

Introduction	9
1. Le mésothéliome pleural malin	10
A. Généralités et physiopathologie du MPM	10
B. Epidémiologie du MPM	10
C. Etiologie du MPM	11
D. Particularités tumorales du MPM	13
E. Diagnostic et biomarqueurs du MPM	15
1. Imagerie du MPM	15
2. Cytologie du MPM	15
3. Immunohistochimie du MPM	16
4. Biomarqueurs du MPM	16
F. Traitements du MPM	17
1. Chirurgie	18
2. Radiothérapie	18
3. Chimiothérapie	19
4. Immunothérapies	19
2. La Virothérapie oncolytique	21
A. Historique	21
B. Principe	22
1. Induction d'une mort cellulaire immunogène par les virus oncolytiques	22
2. Mise en place d'une réponse immunitaire antitumorale	23
3. Rôle des lymphocytes T	23
4. OV's et inhibiteurs de points de contrôle immunitaire	26
C. Le virus de la rougeole	26
1. Classification et structure	27
2. Epidémiologie	27

3.	Physiopathologie et signes cliniques	28
4.	Cycle réplicatif	30
5.	Virothérapie oncolytique basée sur le virus de la rougeole	33
D.	OVs autorisés et Essais cliniques.....	39
1.	Généralités	39
2.	OVs et MPM	41
3.	Les essais cliniques du MV	41
3.	Sensibilité et résistance des tumeurs aux virus oncolytiques.....	45
A.	Interaction des virus avec la cellule tumorale	47
1.	Tropisme	47
2.	Réponse cellulaires antivirales	51
3.	Cycle cellulaire, métabolisme	63
B.	Le micro environnement tumoral et les virus	75
1.	Vascularisation / Perméabilité vasculaire des tumeurs	76
2.	Les anticorps neutralisants	77
3.	Matrice extracellulaire	80
C.	Populations cellulaires résidentes	83
1.	Généralités	83
2.	Influence des populations cellulaires stromales sur les OVs.....	84
4.	Les modèles 3D	88
A.	Généralités et nomenclature	88
B.	Les sphéroïdes tumoraux	90
1.	Mécanismes de formation	90
2.	Caractéristiques des sphéroïdes tumoraux	91
	Hypothèses et objectifs	94

Résultats	97
1. Reduced proliferation of mesothelioma cell lines cultured as spheroids decreases replication of oncolytic attenuated measles virus	98
2. Résultats complémentaires	128
A. Introduction.....	128
B. Méthode	128
C. Résultats	129
3. Oncolytic attenuated measles virus encoding NY-ESO-1 induces HLA I and II presentation of this tumor antigen by melanoma and dendritic cells	131
Discussion et perspectives	167
La prolifération réduite des lignées cellulaires de mésothéliome cultivées en sphéroïdes diminue la réplication du virus oncolytique atténué de la rougeole	170
A. Pertinence du modèle de culture	170
B. Les sphéroïdes de MPM sont peu permissifs à la réplication du MV de façon indépendante de la réponse IFN de type I	174
C. La dormance des cellules tumorales en sphéroïdes limite les capacités oncolytiques du MV.....	176
1. La dormance	176
2. Influence de l'EGF sur la réplication virale	178
D. Autres facteurs de restriction aux OV dans les sphéroïdes de MPM	179
1. Les récepteurs viraux	179
2. La matrice extracellulaire	180
3. Les voies inflammatoires	181
E. Perspectives	181
1. Le modèle de culture	181
2. Implications thérapeutiques de la dormance tumorale pour les OV	183
3. Implications thérapeutiques des autres facteurs de résistance	184

**Le virus oncolytique atténué de la rougeole codant pour NY-ESO-1 induit la
présentation HLA I et II de cet antigène tumoral par le mélanome et les
cellules dendritiques. 186**

Références	190
ANNEXES	244
Annexe 1 : Liste des publications et communications scientifiques.....	245
Annexe 2 : Homozygous Co-Deletion of Type I Interferons and CDKN2A Genes in Thoracic Cancers: Potential Consequences for Therapy	246

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3-MA : 3-Methyladenine	CSC : cellules souches cancéreuses
AAV : <i>adeno associated virus</i>	CSF1-R : <i>colony stimulating factor 1 receptor</i>
ADNc : ADN complémentaire	CSH : cellules souches hématopoïétiques
ADNmt : ADN mitochondrial	CTLA-4 : <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
AIM2 : <i>absent in melanoma 2</i>	CXCL : <i>chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
ALR : <i>AIM2-like receptors</i>	DAMP : <i>damage associated molecular pattern</i>
AMP : <i>antimicrobial peptides</i>	DC : <i>dendritic cells</i>
ANTXR1 : anthrax toxin receptor 1	DDX3 : <i>DEAD-box polypeptide 3, X-linked</i>
AREG : amphireguline	DRP1 : <i>dynamain-related protein</i>
ARNdb : ARN double brin	EBV : <i>Epstein-Barr virus</i>
ASC : <i>apoptosis- associated Speck-like protein containing a CARD</i>	ECM : <i>extracellular matrix</i>
ATP : adénosine triphosphate	EGF : epidermal growth factor
BAP1 : <i>BRCA1-associated protein 1</i>	EGFR : <i>epidermal growth factor receptor</i>
BRCA1 : <i>breast cancer 1</i>	EMA : <i>european medicines agency</i>
BTC : bétacelluline	EMT : <i>epithelial-mesenchymal transition</i>
CAF : <i>cancer-associated fibroblast</i>	EPI : épigène
CALR : calréticuline	EREG : épireguline
CAR : <i>chimeric antigen receptor</i>	ESCRT : <i>endosomal sorting complex required for transport</i>
CCL2 : chimiokine ligand 2	F : protéine de fusion
CCN1 : protéine matricielle cysteine rich 61	FADH2 : flavine adénine dinucléotide
CDC : <i>complement-dependent cytotoxicity</i>	FasL : ligand de Fas
CDK : <i>cyclin-dependent kinase</i>	FBLN3 : fibuline3
CDKi : <i>cyclin-dependant kinase inhibitor</i>	FDA : <i>food and drug administration</i>
CDKN2A : <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>	FGF2 : <i>fibroblast growth factor 2</i>
CEA : <i>carcinoembryonic antigen</i>	FISH : <i>fluorescence in situ hybridization</i>
cGAS : <i>cGAMP synthase</i>	FN1 : fibronectine-1
CLR : <i>C-type lectin receptors</i>	GADD34 : <i>protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A</i>
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité	GAPDH : <i>glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase</i>
CMV : cytomégalovirus	GLUT1 : <i>transporteur de glucose (GLUT) de classe I</i>
Col3A1 : collagène de type III alpha 1	
CPA : cellules présentatrices d'antigène	
CpG : cytosine–phosphate–guanine	

GM-CSF : *granulocyte macrophage colony stimulating factor*

H : hémagglutinine

HAS : haute autorité de santé

HB-EGF : *heparin-binding EGF-like growth factor*

HCV : *hepatitis C virus*

HD : *homozygous deletion*

HGFR : *hepatocyte growth factor receptor*

HIF-1 : *Hypoxia-inducible factor-1*

HMGB1 : *high mobility group box 1*

HPV : *human papillomavirus*

HSP : *heat shock proteins*

HSV-1 : *herpes simplex virus 1*

HVEM : *herpes virus entry mediator*

IAV : *influenza A virus*

ICP : *immune check point*

IFI16 : *gamma-interferon-inducible protein*

IFN : interféron

IFN I : interféron de type 1

IFNAR : *interferon- α/β receptor*

IgG : immunoglobulines de type G

IL : interleukines

IMIG : *international mesothelioma interest group*

IP : intra-péritonéale

IRF3 : *interferon regulatory factor 3*

IRM : imagerie par résonance magnétique

ISG : *interferon stimulated genes*

ISGF3 : *ISG Factor 3*

ISRE : *interferon-stimulated response element*

IT : intratumorale

IV : intraveineuse

JAK1 : *janus associated kinase 1*

L : protéine large

LB : lymphocytes B

LC3b : *microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B*

LDLr : *low density lipoprotein receptor*

LGP-2 : *laboratory of Genetics and Physiology 2*

LRP1 : *low density lipoprotein receptor-related protein 1*

LRRFIP1 : *LRR Binding FLII Interacting Protein 1*

LT : lymphocyte T

LTA : LTs auxiliaires

LTC : LT cytotoxiques

M : protéine de matrice

MAPK : *mitogen-activated protein kinase*

MAVS : *mitochondrial antiviral-signaling*

MDA-5 : *melanoma differentiation associated gene 5*

MFN : mitofusine

MMP : métalloprotéases

MPF : *megakaryocyte potentiating factor*

MPM : mésothéliome pleural malin

MSLN : mésothéline

MUC1 : *mucin-1*

MV : *measles Virus*

MV-Edm : souche Edmonston

MV-Schwarz : souche Schwarz

MxA : *myxovirus resistance protein 1*

MyD88 : *myeloid differentiation primary response 88*

Myxo : Myxomavirus

N : nucléocapside

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NAP : neutrophil-activating protein

NDV : *newcastle disease virus*

NF2 : *neurofibromatose 2*

NF- κ B : *nuclear factor-kappa B*

NIS : symporteur d'iodure de sodium

NK : natural killer

NLR : *nucleotide oligomerization and binding domain*

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

NY-ESO-1 : *new york oesophageal squamous cell carcinoma 1*

OMS : organisation mondiale de la santé

OPA1 : *optic atrophy 1*

OPN : osteopontine

OV : *oncolytic virus*

P : phosphoprotéine

P/D : pleurectomie/décortication

PAMP : *pathogen-associated molecular pattern*

PD-1 : *programmed cell death 1*

pDCs : plasmacytoïdes

PDGF : *platelet-derived growth factor*

PDL-1 : *programmed death ligand 1*

PI3K : phosphoinositide 3-kinase

PKB : protéine kinase B

PPE : pleuro-pneumectomie extrapleurale

pRB : protéine du rétinoblastome

PRR : *pattern recognition receptor*

R0 : nombre de reproduction de base

RdRp : complexe ARN-polymérase ARN-dépendant

RE : réticulum endoplasmique

RIG-I : *retinoic acid inducible gene 1*

RLR : *RIG-I-like receptors*

RNP : complexe ribonucléoprotéique

ROS : *reactive oxygen species*

RR : ribonucléotide réductase

RT : radiothérapie

RV : rhinovirus

SHG : *second harmonic generation*

SLAMF1 : *signaling lymphocytic activation molecule family 1*

SLPI : *secretory leukocyte protease inhibitor*

SMRP : *soluble mesothelin-related peptides*

SPECT/CT : tomographie par émission monophotonique combinée à une tomographie par ordinateur

STAT : *transducer and Activator of Transcription 1/2*

SV40 : *simian virus 40*

TAA : *tumor associated antigen*

TAM : *tumor-associated macrophages*

TAP : transporter associated with antigen processing

TCGA : *the cancer genome atlas*

TCR : T cell receptor

TDM : tomodensitométrie

TEP : tomographie par émission de positons

TGF- α : *transforming growth factor alpha*

TGF β 3 : *transforming growth factor 3*

Th1 : LTs helper de type 1

TIL : *tumor-infiltrating lymphocytes*

TK : thymidine kinase

TLR : *toll-like receptors*

TMP : thymidine monophosphate

TNC : ténascine-C

TNF- α : *tumor necrosis factor α*

TRAIL : *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*

Treg : LTs régulateurs

TRIF : *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon β*

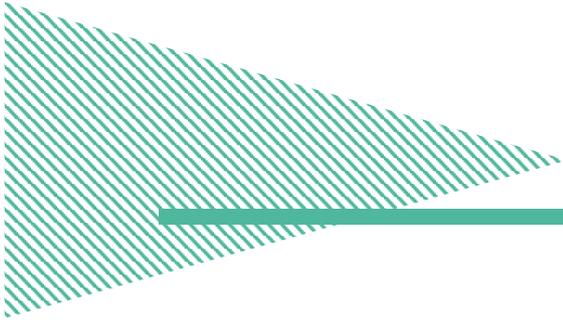
TYK2 : tyrosine kinase 2

UV : ultra-violets

VEGF : *vascular endothelial growth factor*

VV : virus de la vaccine

WT-1 : *Wilms' tumor 1*



INTRODUCTION



1. Le mésothéliome pleural malin

A. Généralités et physiopathologie du MPM

Le mésothéliome pleural malin (MPM) est un cancer agressif rare de la plèvre. Sa première description, par Joseph Lieutaud, date de 1767. Après avoir été caractérisé dans les années 30 par Klemperer et Rabin, le MPM a finalement été reconnu tardivement comme une pathologie cancéreuse à part entière dans les années 60¹. Habituellement associé à une exposition chronique à l'amiante, son incidence progresse malgré l'interdiction d'utilisation dans les pays de l'ouest, le temps d'apparition de la maladie après exposition étant généralement supérieur à 30 ans². L'absence de symptôme en début de maladie rend le diagnostic très tardif, avec une durée de vie réduite. De plus, les modalités thérapeutiques conventionnelles telles que la chimiothérapie ou la radiothérapie présentent une efficacité limitée et sont plutôt considérées comme palliatives³. Le MPM se développe à partir des cellules mésothéliales du mésothélium (**Figure 1**) de la plèvre. Les patients présentent généralement une dyspnée, des douleurs de la paroi thoracique et un épanchement pleural. Le diagnostic n'est souvent posé qu'à un stade avancé de la maladie et la survie médiane des patients non traités est inférieure à 1 an. L'espérance de vie moyenne d'un patient traité est de 18 à 31 mois⁴.

B. Epidémiologie du MPM

Les données les plus récentes sur la consommation d'amiante dans le monde indiquent que celle-ci a significativement diminué depuis que des interdictions ont été promulguées dans un grand nombre de pays à partir des années 1970. Cependant, la période de latence entre l'exposition au cancérigène et l'apparition de la maladie étant supérieure à 30 ans, nous constatons l'apparition d'un pic épidémiologique de la maladie avec 30 000 nouveaux cas en 2020 dans le monde selon l'organisation mondiale de la santé (OMS). Malgré cela, le MPM reste une maladie rare, particulièrement chez les sujets jeunes avec une forte augmentation du taux d'incidence à partir de 50-60 ans. Il touche d'avantage d'hommes que de femmes, cette différence étant attribuée à des expositions professionnelles à l'amiante plus importante dans la population masculine. En effet, pour les personnes ≥ 80 ans, les

taux d'incidence des hommes aux États-Unis et en Europe sont respectivement de 18,9 et 22,8 pour 100 000 ; pour les femmes, ils sont de 3,0 et 3,4 pour 100 000⁵⁻⁸.

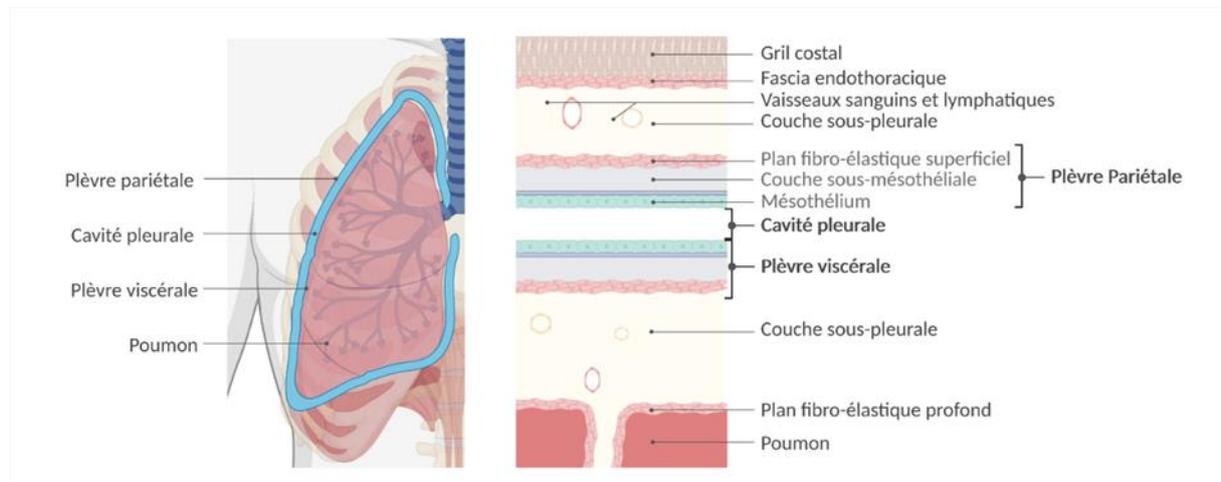


Figure 1 : La plèvre. La plèvre est une fine membrane élastique constituée de l'apposition de 2 feuillets (viscéral et pariétal) formant un sac pleural clos appelé cavité pleurale qui recouvre les poumons et le cœur, et tapisse la paroi de la cavité thoracique. Le liquide pleural lubrifiant contenu entre les deux feuillets permet, par glissement, les mouvements des poumons, du cœur et des organes internes¹. D'un point de vue histologique, la plèvre est une séreuse fine composée de 3 couches cellulaires : Un mésothélium reposant sur une couche sous-mésothéliale et un plan fibro-élastique superficiel.

C. Etiologie du MPM

Les causes étiologiques du MPM sont complexes. Actuellement, la plupart (70 à 90 %) des cas de mésothéliome pleural en Europe et en Amérique du Nord sont causés par une exposition à l'amiante. En effet, entre 2 et 18 % des travailleurs exposés aux formes commerciales d'amiante amphibole ont développé un mésothéliome pleural¹. De fait, le risque de développer un mésothéliome paraît dépendant du type de fibre, les fibres les plus courtes (chrysotile) étant supposées moins cancérigènes que les fibres longues (amphibole)⁹.

D'autres étiologies alternatives, représentant une petite fraction des tumeurs, peuvent être établies même si la grande majorité des MPM non clairement attribuables à l'amiante sont d'origine idiopathique. Dans un premier temps, d'autres fibres minérales que l'amiante peuvent être à l'origine de la transformation tumorale des cellules mésothéliales de la plèvre. On compte parmi elles l'érianite, la fluoro-edenite,

la balangeroite, pour lesquels des cas cliniques ont été répertoriés, ou enfin les nanotubes de carbone, largement utilisés dans l'industrie. Cependant, même si ces derniers peuvent induire des mésothéliomes chez l'animal, il n'existe pas encore de données épidémiologiques humaines à leur sujet^{10,11}. Globalement, la présence d'une inflammation chronique de la plèvre ou des poumons semble contribuer au développement de mésothéliome¹². La radiothérapie pour le traitement d'une première tumeur, notamment pour des lymphomes d'Hodgkin ou non-Hodgkinien, est citée comme une des causes reconnue de mésothéliome avec un risque relatif jusqu'à 30 fois supérieur¹³.

Le virus simien 40 (SV40), un polyomavirus à ADN infectant naturellement les macaques, a été montré comme tumorigénique chez les rongeurs après injection intrapleurale. De plus, des protéines du SV40 présentent un rôle oncogénique, notamment via l'inactivation des suppresseurs de tumeurs p53 et de la protéine du rétinoblastome (pRB : *retinoblastoma protein*) et l'activation d'oncogènes comme le facteur de croissance apparenté à l'insuline (IGF-I : *insuline-like Growth Factor*), le récepteur du facteur de croissance des hépatocytes (HGFR : *hepatocyte growth factor receptor* ou c-Met) et de la voie des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)¹⁴. Entre 1954 et 1963, la contamination de vaccins contre les poliovirus préparés à partir de lignées de cellules de culture de tissus rénaux de singe infectées a largement exposé la population humaine au SV40. Cependant, l'inconsistance des résultats des études épidémiologiques ne permet pas de conclure sur le rôle étiologique du SV40 dans le mésothéliome humain¹⁰.

Enfin, un certain nombre de rapports suggèrent qu'il existe des prédispositions génétiques au MPM. En effet, la mutation ou la délétion germinale de la protéine 1 associée à BRCA1 (*breast cancer 1*) (BAP1 : *BRCA1-associated protein 1*), qui joue un rôle dans la progression du cycle cellulaire, la réparation des dommages à l'ADN et la différenciation cellulaire, confère un haut risque de développement de MPM, se manifestant sous forme familiale¹⁵.

D. Particularités tumorales du MPM

Le MPM est un cancer principalement provoqué par l'inhalation de fibres d'amiante. Si les mécanismes de carcinogénèse des fibres d'amiante ne sont pas encore parfaitement établis, plusieurs théories font néanmoins relativement consensus. Dans un premier temps, la théorie du stress oxydatif, la plus reconnue, soutient que l'incapacité des cellules phagocytaires à digérer les fibres d'amiante induit un environnement particulièrement inflammatoire et un stress oxydatif important favorable à l'apparition de mutations carcinogènes¹⁶. Ensuite, la théorie controversée de « l'enchevêtrement chromosomique » soutient que l'amiante provoque des anomalies chromosomiques structurales et numériques par interaction directe avec l'ADN lors de la division cellulaire. Enfin, la théorie de l'adsorption montre que la présence de fibres d'amiante dans les poumons potentialise l'action cancérigène de certains composants de la fumée de cigarette en les piégeant de par leur charge négative ou positive¹⁷.

L'ensemble des mutations induites directement et indirectement par la présence d'amiante permet la transformation tumorale des cellules mésothéliales, modifiant le fonctionnement de nombreuses voies de signalisation et augmentant ainsi le nombre de cellules qui survivent après une exposition au cancérigène. La présence de cellules tumorales participe ensuite au bouleversement du microenvironnement déjà largement modifié par la présence de fibres d'amiante.

Le MPM présente une charge mutationnelle relativement faible comparée à la plupart des cancers, surtout si on considère son lien avec l'exposition à un cancérigène. Tout d'abord, les études génomiques réalisées révèlent que les principales mutations retrouvées sont essentiellement des pertes de fonction ou des altérations du nombre de copies de gènes suppresseurs de tumeurs^{18,19}. Trois altérations génétiques sont particulièrement définies dans le MPM²⁰.

Les plus fréquentes sont les délétions homozygotes (HD : *homozygous deletion*) du gène inhibiteur de la kinase dépendante de la cycline 2A (CDKN2A : *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) dans la région p21.3 du chromosome 9. Le gène *CDKN2A* code pour les suppresseurs de tumeurs p16^{INK4A} et p14^{ARF}, régulateurs du cycle cellulaire. En effet, la protéine p16 est un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines (CDK : *cyclin-dependent kinase*) 4 et 6 et active la protéine pRB pour

bloquer la transition de phase G1 à S. La protéine p14 active le suppresseur de tumeur p53²¹. L'équipe les a étudiés en collaboration avec le Dr Didier Jean du Centre de Recherche des Cordeliers sur une collection de 78 cultures primaires de mésothéliome à partir de biopsies. Ces HD de *CDKN2A* ont été retrouvés chez 73% des patients et s'étendent jusqu'au locus contenant les 16 gènes qui codent pour les interférons (IFN) de type I (IFN I) chez 23% des patients²². De plus, les études d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH : *fluorescence in situ hybridization*) évaluent que les HD de *CDKN2A* touchent 60 à 80% des patients²³⁻²⁵. Dans l'étude du *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) sur 87 patients, les DH de *CDKN2A* ont été retrouvées chez 49%. Ce résultat est plus faible car la présence de cellules saines dans certaines biopsies de tumeurs peut gêner la détection de ces HD¹⁹.

Les altérations du gène neurofibromatose 2 (*NF2*) sont constatées dans 45-50% des cas sous forme de HD, de mutations d'épissage ou de mutations tronquées. *NF2* code pour la protéine merlin impliquée dans les jonctions adhérentes qui régulent l'adhésion intercellulaire^{19,26}. Sa perte favorise l'invasion tumorale. Enfin, la perte de *BAP-1* est décrite dans au moins 45% des MPM diffus, principalement de type épithélioïde^{2,19}. *BAP1* code pour une protéine désubiquitinyase impliquée dans différents mécanismes cellulaires comme la réparation de l'ADN et la régulation de la transition G1/S lors du cycle cellulaire²⁷. Des analyses génomiques complètes ont démontré que d'autres gènes sont fréquemment mutés dans le MPM, dont des régulateurs épigénétiques : *TP53*, *WIF1*, *SETD2*, *DDX3X*, *ULK2*, *RYR2*, *CFAP45*, *SETDB1* et *DDX51*, *SF3B1* et *TRAF7*^{17-19,28}.

Ensuite, la transformation tumorale des cellules mésothéliales implique également la surexpression de protéines sans véritable amplification génique¹⁷. Ainsi, l'expression de différents récepteurs à tyrosine kinase a été décrite comme fortement activée lors du processus de tumorigénèse du MPM. De fait, le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR : *epidermal growth factor receptor*) est surexprimé dans 50 à 95% des cas de MPM. L'autophosphorylation de ce récepteur induit une activation constitutive de la voie, dont la cascade de signalisation passant notamment par les MAPK entraîne l'expression de proto-oncogènes et donc une forte croissance cellulaire^{29,30}. Les suractivations des voies de l'IGF-I³¹, de l'HGF lié à la voie c-Met (ou HGFR), du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF : *platelet-derived growth factor*)³² et du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF :

vascular endothelial growth factor)³³ ont également été décrites comme caractéristiques du MPM.

Enfin, d'autres voies sont décrites pour leur rôle dans le processus de transformation tumorale et d'invasion, comme la voie de la phosphoinositide 3-kinase / protéine kinase B (PI3-K/AKT ou PKB : *phosphoinositide 3-kinases / Protein kinase B*), les voies du *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B) et de l'inflammasome³⁴, ainsi que la voie de signalisation Hippo¹⁷.

E. Diagnostic et biomarqueurs du MPM

Il n'existe pas de programme de dépistage du MPM. Ainsi, le diagnostic, le pronostic et le suivi clinique de ce cancer sont actuellement permis par un ensemble de techniques d'imagerie et d'immunohistochimie, à la lumière d'une potentielle exposition à l'amiante. Néanmoins, le MPM étant un cancer présentant certaines caractéristiques moléculaires spécifiques, plusieurs biomarqueurs sanguins sont à l'étude.

1. Imagerie du MPM

Actuellement, la tomodensitométrie (TDM) est utilisée pour diagnostiquer et suivre le traitement du MPM. Cette technique permet de mettre en évidence la présence de plaques avec un épaissement et un épanchement pleural. Les tumeurs peuvent être localisées ou diffuses. L'analyse volumétrique permet l'estimation d'un premier pronostic, la taille de la plaque tumorale étant fortement corrélée avec la survie du patient. Ensuite, l'étendue de la maladie peut être évaluée grâce à l'imagerie métabolique avec la tomographie par émission de positrons au fluorodéoxyglucose marqué au 18F, révélant les évolutions extra thoraciques de la maladie. L'invasion du diaphragme peut également être diagnostiquée grâce à l'imagerie par résonance magnétique (IRM)³⁵.

2. Cytologie du MPM

En 2015, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a classé le MPM en trois sous-types histologiques majeurs. Ainsi, le MPM épithélioïde est caractérisé par des cellules cuboïdes et des noyaux visibles (50% à 70%), le MPM sarcomatoïde présente

des cellules allongées en forme de fuseau (10% à 20%) et la troisième catégorique est représentée par des cellules à phénotype intermédiaire, le MPM biphasique (10% à 20%). Le MPM épithélioïde est le plus fréquent et son pronostic plus favorable^{8,28}.

La cytologie est souvent la procédure de diagnostic réalisée sur le patient en première intention car la présence d'un épanchement pleural est généralement le premier signe clinique du MPM et son soulagement par drain permet une analyse des cellules récoltées dans le liquide extrait. Cependant, l'invasion du tissu adipeux sous-pleural, premier critère de malignité, n'est pas évaluable par cette méthode, qui ne permet donc pas la distinction entre les lésions bénignes et malignes de la plèvre. De plus, les MPM de type sarcomatoïde rejettent relativement peu de cellules dans la cavité pleurale³⁶. C'est pourquoi une imagerie suggérant un MPM doit toujours être accompagnée d'une confirmation immunohistochimique du diagnostic, réalisée sur des fragments de tissus cancéreux obtenus par biopsie. Certains patients ne pouvant pas bénéficier d'une biopsie, la cytologie reste néanmoins une technique de diagnostic fiable, même si sa sensibilité est plus faible (35-75%)³⁷.

3. Immunohistochimie du MPM

Il n'existe pas de marqueur spécifique du MPM. Ainsi, selon les recommandations du Groupe international d'intérêt du mésothéliome (IMIG : *international mesothelioma interest group*), un panel de différents marqueurs spécifiques du MPM et de l'adénocarcinome pulmonaire, principal cancer avec lequel le MPM peut être confondu, a été établi. Les marqueurs de MPM les plus classiquement analysés actuellement sont la calrétinine, les cytokératines 5/6, le *Wilms' Tumor 1* (WT-1), le D2-40 ou podoplanine, la mésothéline (MSLN) et la mucine transmembranaire hautement glycosylée (MUC1). Les marqueurs d'adénocarcinome pulmonaire sont l'antigène carcinoembryonnaire (CEA : *carcinoembryonic antigen*), B72.3, BG8, BerEP4, MOC-31 et dernièrement, la claudine 4³.

4. Biomarqueurs du MPM

L'utilisation de biomarqueurs est à l'heure actuelle un outil précieux pour la caractérisation du MPM et son pronostic. Leur utilisation pour le dépistage, le diagnostic ou le suivi de l'évaluation du MPM étant une problématique récente et devant encore être évaluée, les recherches en ce sens sont néanmoins

particulièrement encouragées et quelques données prometteuses ont par ailleurs été publiées³.

Ainsi, Le peptide apparenté à la mésothéline soluble (SMRP : *soluble mesothelin-related peptides*), une forme soluble de MSLN qui est libérée dans la circulation par les cellules tumorales, est le seul biomarqueur approuvé par la *Food and Drug Administration* (FDA) pour le diagnostic du MPM, en particulier pour distinguer les pathologies liées à l'amiante. Certaines études mettent également en évidence la SMRP comme permettant de faire la distinction entre le MPM et les métastases pleurales³⁸⁻⁴⁰. Notamment, une méta-analyse de l'efficacité diagnostique de la SMRP soluble chez >4000 patients a estimé la sensibilité et la spécificité à 47% et 95%, respectivement⁴¹.

Les principaux autres biomarqueurs en étude pour le MPM sont la *high mobility group box 1* (HMGB1)^{42,43}, le facteur mégacaryocytes de potentialisation (MPF : *megakaryocyte potentiating factor*)⁴⁴, l'ostéopontine (OPN)⁴⁵ et la Fibuline3 (FBLN3)^{3,46}. Cependant, ces marqueurs ne sont considérés que comme des informations pronostiques. Notre équipe a participé à la mise en évidence de nouveaux marqueurs de MPM et d'adénocarcinome pulmonaire prometteurs à partir de liquides pleuraux tels que le collagène de type III (Col3A1 : *collagen Type III Alpha 1 Chain*), la chimiokine *chemokine (C-C motif) Ligand 2* (CCL2) et la galactine-3⁴⁷. Nous avons notamment constaté une amélioration de la sensibilité du diagnostic lors de la combinaison des marqueurs CCL2/SMRP/Galectine-3⁴⁸.

D'autre part, les analyses des profils d'expression des micro-ARN du MPM présentent des résultats prometteurs. De fait, l'hétérogénéité extrême des résultats retrouvée aujourd'hui est essentiellement liée à la récente émergence de ce domaine d'étude⁴⁹. La maturation de cette voie de recherche devrait sans doute donner des résultats intéressants dans les années qui viennent.

F. Traitements du MPM

Le MPM est un cancer très agressif dont la survie médiane n'excède pas une année et pour lequel aucune thérapie curative n'est actuellement efficace. Les traitements de référence actuels, qui n'ont pas été modifiés depuis 2009, ne prolongent la médiane de survie des patients que de quelques mois³⁷. Cependant, bien qu'aucun

biomarqueur prédictif ne soit officiellement utilisé en clinique, l'identification précise de l'histologie du MPM et la présence de marqueurs moléculaires tels que le ligand de mort programmée 1 (PDL-1 : *programmed death-ligand 1*), BAP-1 et CDKN2A sont d'une importance pronostique et permettent de déterminer un plan de traitement optimal³. De plus, même si les progrès thérapeutiques demeurent modestes, de nombreuses nouvelles options de traitement voient le jour. Ces innovations récentes poussent à l'approfondissement de ces recherches afin de faire évoluer le traitement du MPM.

1. Chirurgie

L'établissement d'une stadification précoce de la maladie associée à une sélection drastique des patients ayant un statut de performance tolérable et une réserve cardiorespiratoire permet de déterminer leur éligibilité à une prise en charge chirurgicale (1 à 2% des patients)³. Celle-ci consiste en deux types d'intervention : la pleurectomie/décortication (P/D) correspondant à une résection de la plèvre pariétale et viscérale et la pleuro-pneumectomie extrapleurale (PPE) qui consiste à réséquer la totalité du poumon, de la plèvre, du péricarde et une partie du diaphragme⁵⁰. Ces mesures sont très invasives, difficiles à supporter pour le patient, et n'apportent pas ou peu de bénéfice en terme de survie globale et de survie sans maladie chez les patients, avec ou sans traitement⁵¹. Néanmoins, pour les rares patients pouvant profiter d'une intervention chirurgicale dans le cadre d'un traitement multimodal, les directives ERS/ESTS/EACTS/ESTRO recommandent une P/D étendue plutôt qu'une PPE afin de préserver une bonne qualité de vie postopératoire³.

2. Radiothérapie

La radiothérapie (RT) joue un rôle important dans la prise en charge du MPM et peut être administrée dans un cadre adjuvant, néo adjuvant et palliatif. Cette approche permet notamment un très bon contrôle de la maladie après une prise en charge chirurgicale⁵². Néanmoins, il s'agit d'une approche thérapeutique particulièrement agressive et qui n'est proposé qu'à un nombre restreint de patients³.

3. Chimiothérapie

Bien que le MPM soit une tumeur peu chimiosensible, l'initiation précoce d'une chimiothérapie pour les formes inopérables est préférable. La chimiothérapie est donc la première ligne de traitement du MPM, à base de cisplatine (sels de platine), médicament le plus efficace en termes de taux de réponse, et de pémétréxed, associée à une supplémentation en acide folique et en vitamine B12²⁰. Les sels de platine sont des agents alkylants. Ils se lient aux guanines, formant des ponts anormaux entre les deux brins de l'ADN. Le complexe ADN-platine, appelé adduit, inhibe la réplication de l'ADN en bloquant la progression des enzymes de réplication le long de la molécule, entraînant un effet cytotoxique⁵³. Le pémétréxed est un anti-métabolite analogue de l'acide folique. Il inhibe l'action d'enzymes folate-dépendantes, jouant un rôle clef dans la biosynthèse de novo de la thymidine et des nucléotides puriques, empêchant ainsi la division cellulaire⁵⁴.

4. Immunothérapies

L'immunothérapie est une stratégie thérapeutique récente ayant révolutionné le traitement de nombreux cancers, notamment grâce aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaires (ICP : *immune check point*). Les ICP sont des régulateurs du système immunitaire, notamment des lymphocytes T (LT), jouant un rôle crucial dans la tolérance du soi. Certaines cellules tumorales sont capables d'exprimer ces points de contrôle afin d'inhiber l'action des cellules immunitaires contre la tumeur.

Dans le cadre du MPM, la présence d'infiltrat lymphocytaire dans la tumeur chez les patients souffrant d'un MPM étant corrélée avec un bon pronostic⁵⁵, le traitement par inhibiteur d'ICP permet de lever l'inhibition des LTs induite par les cellules tumorales et améliore considérablement la survie globale des patients. De ce fait, la FDA a récemment approuvé l'ajout de deux inhibiteurs d'ICP comme option de traitement de première ligne pour les MPM inopérables³⁵. L'association nivolumab, un anti-*programmed cell death 1* (PD-1) et ipilimumab, un anti-*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4) est maintenant un traitement de première ligne du MPM non résecable. Les protéines PD-1 et CTLA-4, exprimées par les LT activés, interagissent avec leurs récepteurs respectifs, PD-L1, souvent surexprimé par les cellules tumorales, et les molécules de costimulation CD80 et CD86, exprimées par

les cellules présentatrices d'antigène (CPA). Cette interaction inhibe l'action des LT via une boucle de rétrocontrôle négative. De plus, les LTs régulateurs (Treg) expriment de manière constitutive CTLA-4 qui participe à leur fonction suppressive des réponses T^{56,57}. L'association de ces deux inhibiteurs d'ICP a certes démontré sa supériorité en termes de survie globale par rapport à l'association cisplatine-pémétréxed. Cependant, le risque de progression initialement augmenté chez les patients recevant cette association conduit la Haute Autorité de Santé (HAS) à recommander une utilisation prudente de cette double immunothérapie.

Par ailleurs, d'autres immunothérapies ciblées non basées sur les inhibiteurs d'ICP ont pu donner des résultats intéressants. Notamment, un essai clinique de phase III a également montré que l'association du bevacizumab (anti-VEGF), un inhibiteur de l'angiogenèse, au cisplatine et pémétréxed améliorait la survie globale des patients, bien que cet anticorps ne soit actuellement pas commercialisé dans cette indication⁵⁸⁻

60

2. La Virothérapie oncolytique

A. Historique

Les premières observations rapportées des effets oncolytiques des virus ont été réalisées dans les années 1880 lors de rémissions de leucémies après infection à influenza virus⁶¹. Au début du XXème siècle, de nombreuses observations d'activité anticancéreuse attribuables à un virus ont été recensées. Notamment, la régression de cancers du col de l'utérus après vaccination contre le virus de la rage, de lymphome de Burkitt et de Hodgkin après infection par le virus de la rougeole et d'autres cas de lyses tumorales par le virus de la maladie de Newcastle et le virus de la grippe⁶². C'est pourquoi dans les années 1950 et 1960 émergent un certain nombre d'essais précliniques et cliniques dans l'objectif de comprendre et d'exploiter les fonctions anticancéreuses des virus. Malgré le fait que certains virus pathogènes pour l'homme aient pu démontrer de remarquables propriétés anticancéreuses dans des circonstances favorables encore aujourd'hui méconnues, la majorité d'entre eux n'ont démontré à l'époque qu'une efficacité transitoire, avec de nombreux effets secondaires non négligeables dus à leur forte pathogénicité. En ce qui concerne l'utilisation des virus non humains, ils ont montré des résultats prometteurs lors d'études précliniques sur des rongeurs mais ont majoritairement échoué à améliorer la survie des patients humains, démontrant surtout la vacuité de certaines études sur des modèles animaux, notamment lors de l'étude du tropisme de souches virales⁶³.

A l'époque, l'étude des virus, tout comme la biologie moléculaire, en était encore à ses balbutiements et l'élan de leur utilisation comme agents antitumoraux s'est rapidement essoufflé, notamment devant la difficulté à modifier leurs propriétés infectieuses et tropiques. Ce sont l'émergence des techniques de génie génétique et la possibilité de modifier les génomes viraux facilement qui ont donné un nouveau souffle à la virothérapie oncolytique au début des années 1990, appuyées par une meilleure compréhension des mécanismes de fonctionnement des virus et de l'immunologie humaine.

B. Principe

La virothérapie oncolytique consiste en l'utilisation d'un virus capable de se répliquer spécifiquement dans les cellules tumorales et de les lyser directement, sans pour autant lyser les cellules saines. Certains virus présentent une capacité naturelle à se répliquer préférentiellement dans les cellules tumorales tandis que d'autres virus peuvent être modifiés afin de les rendre dépendants des voies cellulaires ou des mécanismes particuliers retrouvés dans les cellules cancéreuses⁶⁴.

Cependant l'efficacité de cette thérapie réside en réalité essentiellement dans la capacité des virus à induire une réponse immunitaire anti-tumorale⁶⁵. En effet, la lyse directe des cellules tumorales favorise la mise en place d'un infiltrat immunitaire dans la tumeur et le retour d'une réponse adaptative en modulant le microenvironnement immunosuppresseur⁶⁶.

1. Induction d'une mort cellulaire immunogène par les virus oncolytiques

Pendant longtemps, la mort cellulaire était considérée comme une conséquence inévitable, signifiant simplement le dysfonctionnement et l'arrêt de la vie cellulaire. Cependant, un grand nombre de preuves expérimentales accumulées au cours des dernières décennies montre que des processus complexes, génétiquement codés, sont à l'œuvre lorsqu'il s'agit d'éliminer des cellules superflues, endommagées ou dangereuses. Ces mécanismes diffèrent selon le contexte cellulaire et adressent des messages subtils aux cellules environnantes, garantissant ainsi le bon fonctionnement tissulaire⁶⁷. La pyroptose, l'apoptose et la nécroptose sont les voies de mort cellulaire programmées les plus couramment étudiées. Celles-ci font partie intégrante de la réponse immunitaire innée antivirale de l'hôte. Même s'il a été montré que ces trois voies peuvent être activées pendant une infection virale, il a été également montré que l'infection par un virus favorise essentiellement une mort inflammatoire servant de levier à la mise en place d'un mécanisme antiviral⁶⁸. En effet, la cellule, en réponse à une infection virale, va déclencher des programmes de mort immunogène permettant d'alerter le système de défense de l'organisme⁶⁹.

Dans le cadre de la virothérapie oncolytique, il a été montré que cette mort immunogène est dans un premier temps caractérisée par l'expression et/ou la

libération de motifs moléculaires associés aux dommages (DAMP : *damage associated molecular pattern*). Parmi eux est couramment décrite l'exposition à la surface des cellules tumorales mourantes d'une protéine chaperonne du réticulum endoplasmique (RE), la calréticuline (CALR). De l'adénosine triphosphate (ATP), la protéine HMGB1 et d'autres protéines de choc thermique (HSP : *heat shock proteins*) telles que HSP27, 70 et 90 pro-inflammatoires sont aussi relarguées dans le milieu extracellulaire⁶⁶. Les virus oncolytiques favorisent également la libération de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines par les cellules tumorales telles que les IFN I et II, les interleukines (IL) IL-6, IL-7, IL-18, le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α : *tumor necrosis factor α*), les ligands de chimiokines (CXCL : *chemokine (C-X-C motif ligand)*) CXCL9, CXCL10 et CXCL11⁷⁰. Lors de la lyse, on constate enfin la libération de motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP : *pathogen-associated molecular pattern*) dans le milieu tumoral ainsi que d'antigènes associés à la tumeur (TAA : *tumor associated antigen*)⁷¹.

2. Mise en place d'une réponse immunitaire antitumorale

La libération de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines permet le recrutement par chimiotaxie de cellules immunitaires, dont des CPA (mastocytes, macrophages et cellules dendritiques (DC : *dendritic cells*)). Ces cellules, notamment les DCs, peuvent alors internaliser les antigènes provenant de la lyse cellulaire et du virus. La libération des DAMPs et des PAMPs dans le microenvironnement tumoral, associée à l'inflammation locale, permet leur activation (maturation), se caractérisant entre autres par une augmentation du CD83, des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 (aussi appelées B7-1 et 2), d'une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et d'une diminution de l'activité phagocytaire. Le changement d'expression de leurs récepteurs à chimiokine pour des récepteurs spécifiques des chimiokines sécrétées par les cellules des organes lymphoïdes secondaires permet leur migration afin de présenter les antigènes phagocytés aux LTs et lymphocytes B (LB)⁷²⁻⁷⁴.

3. Rôle des lymphocytes T

Les LTs jouent un rôle anti tumoral central, notamment dans le MPM⁵⁵. Effecteurs de la réponse immunitaire adaptative, ils sont la clef de voute de l'efficacité thérapeutique des virus oncolytiques (OV : *oncolytic virus*). Les DCs sont considérées

comme médiatrices innées de la réponse immunitaire adaptative effectrice menée par les LTs. A leur arrivée dans les organes lymphoïdes secondaires, elles présentent les peptides issus d'antigènes internalisés sur le site tumoral infecté via des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ces voies de présentation sont résumées dans la **figure 2**^{75,76}.

Le contexte cytokinique associé à la présentation antigénique par les DCs dans les ganglions lymphatiques induit l'activation de LT CD4+ et CD8+ spécifiques des antigènes présentés. Les LTs atteindront ensuite le site tumoral via la circulation sanguine où ils exerceront leurs activités cytotoxiques contre les cellules cancéreuses exprimant les antigènes les ayant activés, notamment les TAAs⁷⁷.

L'activité cytotoxique des LTs CD8+ et CD4+ est déclenchée par mécanisme contact-dépendant avec la reconnaissance spécifique d'un complexe CMH-peptide à la surface d'une cellule. Les LT cytotoxiques (LTC) induisent la mort de la cellule reconnue par deux mécanismes. Tout d'abord, la fusion membranaire mise en place lors de la synapse immunologique entre le LTC et la cellule cible permet le déversement de granules cytotoxiques dans l'espace intercellulaire au plus près de la cellule cible. Ces granules contiennent de la perforine et du granzyme B. La perforine est une protéine cytolytique s'insérant dans les membranes et formant un canal qui permet l'entrée du granzyme B, une sérine protéase dégradant les protéines de la cellule cible. Parallèlement, le LTC exprime le ligand de Fas (FasL) et le TNF- α dont la liaison à leurs récepteurs respectifs (Fas (CD95) et TNFR1/2), induit l'activation de voies apoptotiques⁷⁸⁻⁸⁰. L'activation des LTCs et des LTs auxiliaires (LTA) permet et renforce également le recrutement d'autres cellules immunitaires via leurs sécrétions cytokiniques, amplifiant la réponse immunitaire antitumorale⁶⁶

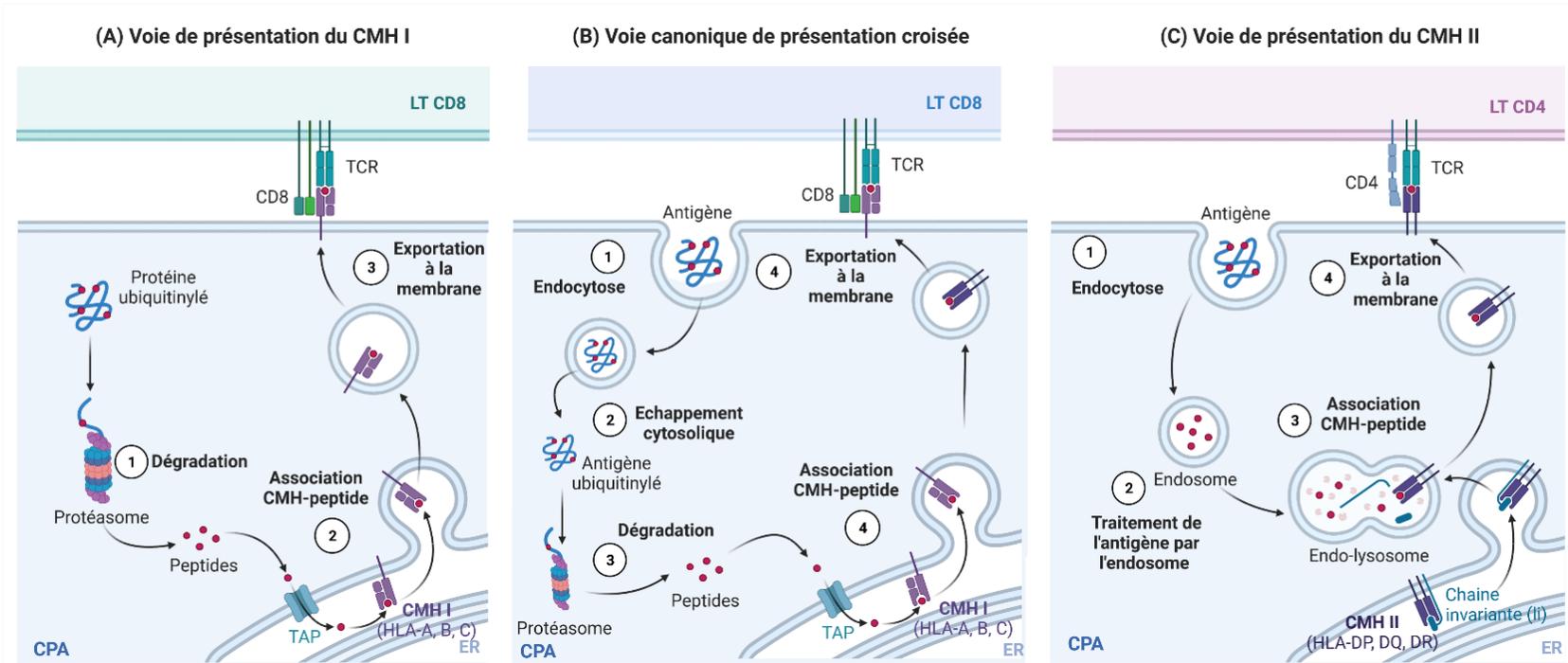


Figure 2 : Voies de présentation des antigènes aux LTs. (A) Les protéines endogènes sont ubiquitinylées, permettant leur dégradation par le protéasome. Les peptides issus de cette dégradation sont transloqués dans RE par les molécules de transport associées au traitement des antigènes (TAP : *Transporter associated with antigen processing*). Ils peuvent ensuite être chargés sur un des CMH I. Le complexe CMH-I-peptide est ensuite exporté à la membrane, où il pourra être reconnu par un LT CD8 via son récepteur des LT (TCR : *T Cell Receptor*) et son co-récepteur CD8. (B) Les antigènes exogènes sont internalisés par une voie d'endocytose ou de phagocytose. En ce qui concerne la voie canonique de présentation croisée, leur translocation dans le cytosol permet leur dégradation par le protéasome et les peptides issus de cette dégradation peuvent ensuite suivre la même voie que les peptides issus de protéines endogènes (A). (C) Les CMH-II sont synthétisés dans le RE, protégés par la chaîne invariante Li qui bloque le sillon de présentation de la molécule. Les antigènes exogènes sont internalisés par une voie d'endocytose ou de phagocytose. Les endosomes contenant ces antigènes et ceux contenant les CMH II fusionnent avec des lysosomes précoces. L'acidification de ces lysosomes permet l'activation d'enzymes dégradant à la fois les antigènes en peptides et la chaîne li. Les peptides produits peuvent alors être chargés sur le CMH II. Le complexe CMH-II-peptide est ensuite exporté à la membrane, où il pourra être reconnu par un LT CD4 via son TCR et son co-récepteur CD4.

4. OV_s et inhibiteurs de points de contrôle immunitaire

L'immunothérapie à base d'inhibiteurs de points de contrôle immunitaire (ICP : *immune check point*) a révolutionné la prise en charge de nombreux cancers. Dans le cadre du MPM, lorsqu'une infiltration lymphocytaire est présente dans les tumeurs, le traitement par inhibiteur d'ICP permet l'inversion de l'inhibition des LT induite par les cellules tumorales et améliore significativement la survie globale des patients⁸¹. Cependant, lorsque cette infiltration est peu ou pas présente, le bénéfice des inhibiteurs d'ICP demeure faible voir inexistant⁸².

Dans ce contexte, l'utilisation des OV_s afin de « réchauffer » la tumeur pour appuyer l'effet des inhibiteurs d'ICP a été mise en lumière par de nombreuses études. Ainsi, l'utilisation d'anticorps bloquant CTLA-4 ou PD-1 en association dans des études précliniques avec de nombreux OV_s comme le virus oncolytique de la maladie de Newcastle (NDV : *newcastle disease virus*), le virus de la vaccine (VV), le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), le réovirus ou le virus Maraba démontrent une synergie intéressante entre ces deux thérapies⁶⁶. Il a notamment été constaté qu'un virus de la rougeole (MV) codant pour des anticorps contre CTLA-4 ou PD-L1 induit dans un modèle murin immunocompétent la mise en place d'un infiltrat lymphocytaire avec un profil immunitaire favorable associé à une prolongation significative de la survie des animaux⁸³.

C. Le virus de la rougeole

Différents types de virus sont actuellement évalués en tant qu'agents oncolytiques dans de nombreux cancers comme dans le MPM⁶⁴. Parmi eux, les souches atténuées du virus de la rougeole (MV : *measles virus*) sont particulièrement prometteuses. En effet, en plus de posséder un très bon profil d'innocuité avec un recul thérapeutique de plus de 60 ans de vaccination, ces souches démontrent un fort potentiel lytique et immuno-adjuvant spontané contre les tumeurs. Enfin, elles peuvent facilement être modifiées génétiquement dans l'objectif d'optimiser leur efficacité avec une grande capacité d'insertion de gènes étrangers (>6 kb)^{84,85}.

1. Classification et structure

Le virus de la rougeole (*Measles morbillivirus*), de la famille des Paramyxoviridae, sous-famille Orthoparamyxovirinae, est un virus enveloppé sphérique dont le diamètre varie de 100 à 300 nm. Son génome, un ARN à simple brin négatif linéaire non segmenté de 16 kb est composé de 6 gènes codant pour 8 protéines^{86,87} et séparés par des régions intergéniques non transcrites (**Figure 3**).

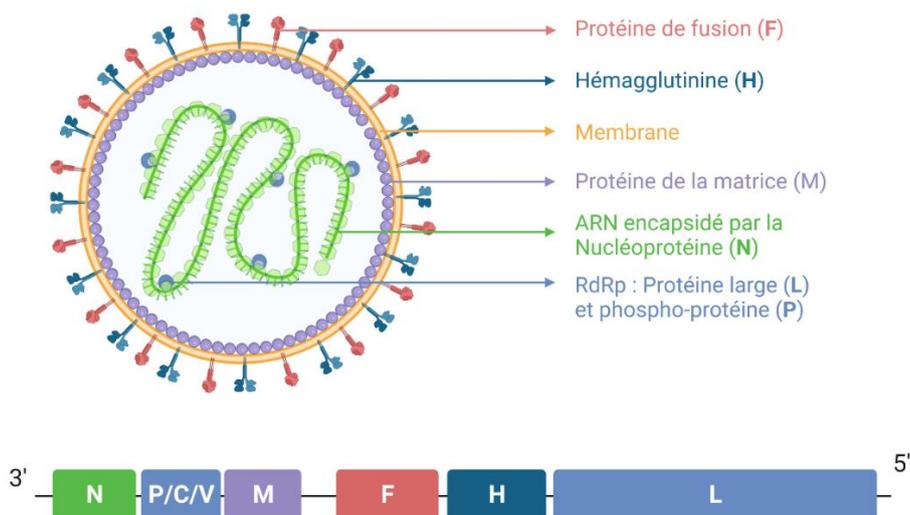


Figure 3 : structure du virion et du génome du virus de la rougeole. Les protéines d'attachement hémagglutinine (H) et de fusion (F) sont deux complexes glycoprotéiques de l'enveloppe virale respectivement responsables de la liaison aux récepteurs de la cellule cible et de l'entrée par fusion de l'enveloppe avec la membrane de la cellule cible. L'ARN génomique encapsidé par la protéine de nucléocapside (N) forme un complexe ribonucléoprotéique (RNP) hélicoïdal qui sert de matrice au complexe ARN-polymérase ARN-dépendant (RdRp). Le RdRp est composé de la protéine large (L) et de la phospho-protéine (P) et fonctionne à la fois comme transcriptase et réplicase virale. La protéine de matrice (M) organise l'assemblage des particules par interaction avec les protéines N du complexe RNP et les complexes glycoprotéiques incorporés dans la membrane. Le gène de la phospho-protéine P code pour deux autres protéines, la protéine V et la protéine C, qui sont des facteurs de virulence dont la transcription est respectivement permise par un processus d'édition de l'ARN et de cadre de lecture alternatif⁸⁸.

2. Épidémiologie

Le virus de la rougeole est un virus pathogène, dont l'Homme est le réservoir principal, responsable de la maladie hautement contagieuse de la Rougeole. Ce virus a émergé entre le 11^{ème} et le 12^{ème} siècle à partir du virus aujourd'hui éradiqué de la peste bovine⁸⁹. Aucun traitement antiviral n'agit à l'heure actuelle contre cette maladie mais un vaccin très efficace et peu coûteux existe depuis les années 1960⁹⁰. En juillet

2010, un groupe d'experts réuni par l'OMS a conclu que la rougeole pouvait et devait être éradiquée par une campagne vaccinale. Cependant, le nombre de reproduction de base (R0) de cette maladie est parmi l'un des plus élevés, défini entre 12 et 18 dans une population non vaccinée. La couverture vaccinale permettant d'obtenir une éradication d'une maladie si contagieuse doit être de plus de 95% de la population⁹¹. C'est pourquoi, malgré l'existence d'un vaccin efficace, les régions du monde ont connu des succès variables dans la lutte contre la rougeole.

En plus d'être hautement contagieuse, c'est une maladie potentiellement létale et elle demeure l'une des principales causes de décès évitables par la vaccination dans le monde responsable d'environ 100 000 décès par an en 2017. Les épidémies de rougeoles ont lieu de ce fait en particulier dans les régions du monde ayant un accès restreint au vaccin, principalement à cause de la guerre, comme dans de nombreux pays du continent Africain et en Asie du sud-est^{92,93}. De plus, depuis 2018, on constate une augmentation du nombre de cas dans les pays industrialisés dotés de systèmes de santé faibles et l'OMS a identifié l'hésitation à se faire vacciner comme l'une des 10 principales menaces sanitaires mondiales en 2019^{94,95}. Enfin, l'émergence de la Covid-19 en 2020 a fortement mis à mal les campagnes préventives de vaccination, augmentant le risque d'une nouvelle résurgence de la rougeole dans un avenir proche⁹⁶.

3. Physiopathologie et signes cliniques

La rougeole est une maladie virale aiguë débutant par un ensemble de symptômes prodromiques caractéristiques d'une infection des voies respiratoires supérieures 2 à 4 jours après l'infection : fièvre, toux, coryza et conjonctivite⁹². On note également l'apparition de petites papules blanches au niveau de la muqueuse buccale appelées taches de Koplik⁹⁷. En effet, le virus de la rougeole pénètre dans l'organisme principalement par les voies respiratoires et la conjonctive. Classiquement, les cellules épithéliales de la trachée et des bronches étaient décrites comme les premières cibles de l'infection par MV. Cependant, même si ces cellules expriment un des récepteurs d'entrée du virus, son expression est restreinte au niveau des pôles basaux et basolatéraux cellulaires et n'est pas exprimé sur la face apicale, rendant le mécanisme d'entrée par ces cellules peu probable.

Le virus semble en effet se lier DCs ou aux cellules myéloïdes et aux LTs de l'épithélium mucocilliaire ou des espaces alvéolaires. Un autre site d'entrée potentiel est la conjonctive, qui est riche en DCs et en LTs ⁹⁸. Les cellules immunitaires ainsi infectées vont migrer vers les organes lymphoïdes, propageant l'infection par une réplication massive dans ces compartiments cellulaires riches en LBs et LTs et en cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les cellules infectées des centres lymphocytaires vont ensuite disséminer le virus par voie sanguine. L'infection des cellules myéloïdes et lymphoïdes du derme puis celle des leucocytes et des kératinocytes épidermiques entraînent l'apparition d'un rash⁹⁹.

L'infection des cellules épithéliales de l'arbre respiratoire a lieu à partir de particules virales provenant des cellules immunitaires et se produit à leur pôle basal où le récepteur au MV nectine 4 est exprimé¹⁰⁰. L'infection de ces cellules épithéliales déclenche une toux intense avec projection de gouttelettes contaminées, propageant le virus à d'autres hôtes. Cette excrétion virale importante serait à l'origine de la contagiosité élevée du MV. Dans de rares cas l'infection se propage également aux neurones, aux astrocytes et aux oligodendrocytes⁹⁶, entraînant d'exceptionnels mais sérieux cas parfois létaux de panencéphalite sclérosante subaiguë ¹⁰¹.

Pendant la période aiguë de l'infection une forte immunosuppression, généralement transitoire, sensibilise l'hôte à des infections secondaires, notamment bactériennes⁹⁶. Cette immunosuppression est principalement due à des mécanismes immunopathologiques secondaires^{98,102}. Il a récemment été démontré que l'infection par le MV provoque une diminution de la mémoire immunitaire humorale acquise antérieurement¹⁰³. Ce phénomène, qualifié sous le terme d'« amnésie immunitaire », n'a pas été observé avec les souches vaccinales. La rougeole a entraîné une élimination parfois drastique (11 à 73 %) du répertoire d'anticorps chez les individus infectés, au profit d'un nouveau répertoire dirigé contre des antigènes du MV. En effet, la rougeole induit de fortes réponses immunitaires humorales mais aussi cellulaires assurant une immunisation à vie, principalement grâce à la persistance d'immunoglobulines de type G (IgG) neutralisantes dirigées contre la protéine H virale empêchant la liaison avec les récepteurs des cellules cibles⁹².

4. Cycle réplcatif

Le cycle réplcatif du MV a lieu dans le cytoplasme (**Figure 4**). Le virus est composé d'une nucléocapside entourée d'une enveloppe externe constituée d'une bicouche lipidique provenant de la précédente cellule hôte. De ce fait, l'entrée du MV nécessite la fusion entre la membrane de la cellule hôte et celle du virion. Ce processus est conduit par deux protéines enchâssées dans l'enveloppe virale formant des complexes hétéro-oligomériques : les glycoprotéines tétramériques d'attachement (H) et trimériques de fusion (F)¹⁰⁴. Le tétramère H d'attachement des souches sauvages est capable de se fixer à la cellule hôte via deux récepteurs cellulaires : *signaling lymphocytic activation molecule family 1* (SLAMF1) également appelée CD150 et Nectine-4^{105,106}. Les souches vaccinales atténuées utilisent également le CD46 comme récepteur supplémentaire¹⁰⁷. La liaison du tétramère H à son récepteur déclenche le changement de conformation de la protéine F trimérique. Ce changement provoque l'exposition du peptide de fusion de la protéine F qui peut alors interagir avec la membrane plasmique, permettant la mise en place d'un pore de fusion et la libération du complexe ribonucléoprotéique viral (RNP : l'ARN génomique encapsidé par la protéine N) dans le cytoplasme^{88,108,109}. Le complexe RNP est alors dirigé en zone périnucléaire par un mécanisme encore méconnu¹¹⁰.

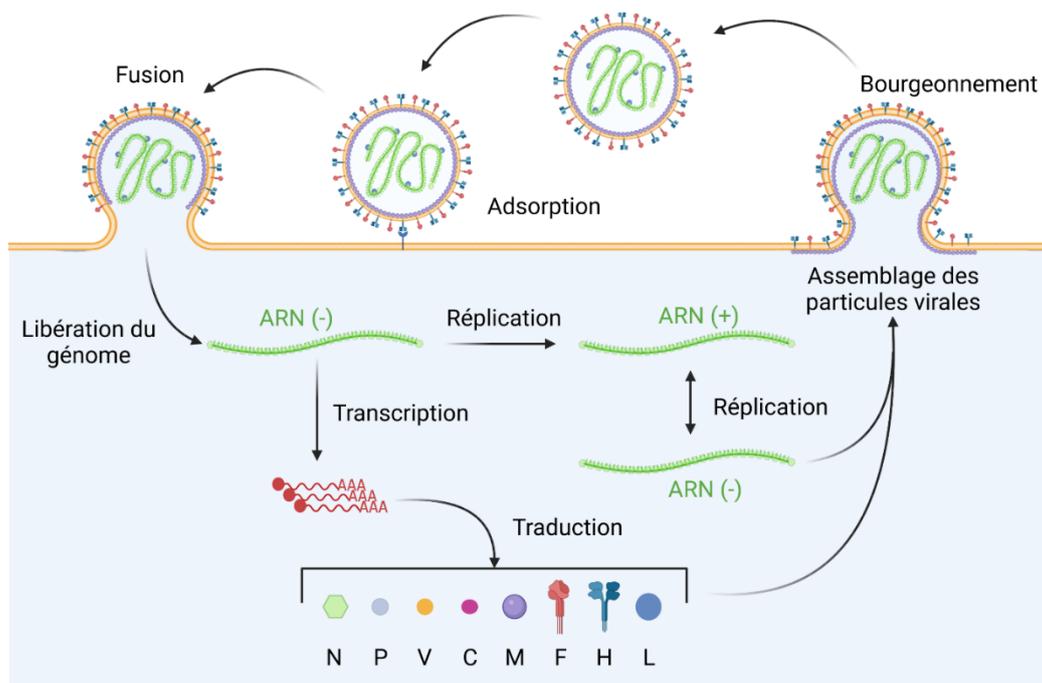


Figure 4 : cycle réplcatif du virus de la rougeole d'après Megan S. Harrison et Al.¹¹¹

La présence de corps d'inclusion, induite par l'infection virale, suppose la mise en place d'usines virales proches du noyau, organisant les organites cellulaires à la faveur de la réplication, de la transcription et de l'assemblage des particules virales^{112,113}. Les mécanismes de formation de ces corps d'inclusion sont encore peu connus. Au sein de ceux-ci, la RNP sert de matrice au complexe ARN-polymérase ARN-dépendant (RdRp) pour la transcription du génome viral.

Le génome est organisé en 6 unités de transcription arrangées dans l'ordre 3'-N-P(V/C)-M-F-H-L-5'. La transcription des ARNm viraux de 3' vers 5' est un mécanisme séquentiel. En effet, l'ARN polymérase peut se détacher à chaque région intergénique, produisant de ce fait une quantité décroissante d'ARNm de 3' vers 5'. Les ARNm sont ensuite polyadénylés, méthylés et coiffés par la protéine L. Ces ARNm nouvellement synthétisés sont traduits en protéines virales grâce aux mécanismes de traduction de la cellule hôte selon des processus encore flous¹¹⁴.

La RNP sert également de matrice au complexe RdRp pour la réplication du génome viral. Il semblerait que la balance relative entre transcription et réplication soit principalement dépendante de la quantité de protéine N libre. En effet, l'ARN génomique nouvellement synthétisé est immédiatement encapsidé par la protéine N, formant le complexe RNP hélicoïdal prêt à être inclus dans de nouvelles particules virales^{114,115}.

L'assemblage des particules virales débute à partir du moment où leurs composants structuraux sont présents en quantité suffisante. La protéine M est centrale dans le processus de formation des nouvelles particules virales. Elle se retrouve en abondance sur la face interne apicale de la membrane plasmique cellulaire au niveau de rafts lipidiques riches en cholestérol¹¹⁶. Elle orchestre dans un premier temps le recrutement des glycoprotéines virales transmembranaires H et F sélectivement transportées vers la surface basolatérale cellulaire¹¹⁷. Elle les oriente au niveau de la face apicale de la cellule hôte, polarisant le bourgeonnement, grâce à son interaction avec leurs queues cytoplasmiques¹¹⁸. La protéine M se lie en parallèle avec les complexes RNP conduits à la face apicale de la membrane par des endosomes de recyclage Rab11A+, renforçant le processus de bourgeonnement polarisé¹¹³. Certaines études ont pu mettre en évidence une association de la protéine M avec la RNP directement dans le cytoplasme, avec un co-transport vers la membrane plasmique. D'autres encore montrent que la protéine M ne forme pas de

couche sous l'enveloppe virale, mais s'associe aux RNP pour former une structure de nucléocapside hélicoïdale couverte par une matrice à l'intérieur du virion¹¹⁹.

Les mécanismes qui permettent le bourgeonnement des particules virales chez les paramyxovirus sont encore largement inconnus. Bien qu'un certain nombre de virus enveloppés utilisent la machinerie de *l'endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT) de la cellule hôte, le virus de la rougeole ne semble pas dépendant de ce complexe pour son bourgeonnement¹¹⁶. Chez la majorité des Paramyxovirus, les protéines M oligomérisées permettent la déformation de la membrane cellulaire et certains motifs de la queue cytoplasmique des glycoprotéines virales semblent impliqués dans la liaison de facteurs cellulaires qui sont habituellement retrouvés dans les voies exocytaires¹¹⁹. Ce processus mène à la production de nouvelles particules virales dans l'espace intermembranaire. Elles sont organisées par la protéine M et enveloppées de la membrane de la cellule hôte enrichie en glycoprotéines virales, contenant le complexe RNP génomique.

Cependant, la propagation latérale de cellule à cellule demeure l'un des principaux moyens de propagation du virus de la rougeole, menant à la formation de cellules multinucléées également appelées syncytiums¹⁰⁴. Ce mécanisme est essentiel car il semble être à l'origine de la transmission de l'infection des cellules myéloïdes aux cellules épithéliales de l'arbre respiratoire, permettant la diffusion du virus à un nouvel hôte¹²⁰. Il a également été observé dans les ganglions lymphatiques, du thymus ou encore au niveau des cellules épithéliales épidermiques^{99,121,122}. Il est généralement admis que la fusion cellulaire induite par le virus de la rougeole est régie par l'interaction entre les glycoprotéines F et H enchâssées dans la membrane de la cellule infectée et les récepteurs cellulaires de la cellule adjacente¹²³. Cependant, il semblerait que la formation de syncytiums soit indépendante du niveau d'expression des récepteurs. De plus, il a été montré que la transmission neuronale s'effectue principalement par les synapses de façon indépendante des récepteurs viraux via des phénomènes de fusion de membranes¹²⁴, indiquant que les mécanismes de transmission cellule-cellule doivent encore être caractérisés.

5. Virothérapie oncolytique basée sur le virus de la rougeole

a) Souches virales oncolytiques

La souche sauvage du MV a été à l'origine de plusieurs rémissions spontanées de cancers hématologiques, notamment dans les années 1970^{125,126}. Depuis lors, de nombreuses études ont mis en avant les propriétés oncolytiques et immuno-adjuvantes des souches atténuées dans différents cancers *in vitro* et *in vivo*. Ces différentes souches atténuées ont été obtenues à partir du premier isolat sauvage de MV dans une culture primaire de cellules rénales humaines, la souche Edmonston (MV-Edm), à travers des cycles de cultures successifs dans divers types cellulaires non permissifs (**Figure 5**)¹²⁷.

La souche Schwarz (MV-Schwarz), utilisée en tant que vaccin en Europe et au Brésil, a été générée en 1962 à partir de sous-cultures du MV-Edm sur des fibroblastes d'embryons de poulet. Bien que le MV soit à l'origine d'une maladie infectieuse pour l'homme potentiellement grave, l'analyse comparative des séquences des souches MV-Edm sauvage et MV-Schwarz a révélé 42 mutations nucléotidiques contribuant à l'atténuation de cette souche¹²⁸. En effet, la souche Schwarz ainsi que les autres souches atténuées du MV actuellement utilisées comme vaccins contre la rougeole peuvent être classées comme agents de classe de risque 1. Elles ne sont pas pathogènes pour l'homme, ne sont pas nocives pour l'environnement et présentent un risque négligeable lors de leur utilisation⁸⁵. De plus la production vaccinale a lieu à partir de vecteurs de MV atténués fabriqués par génétique inverse à partir d'ADN complémentaire (ADNc), assurant la stabilité génétique des différentes souches de vaccin^{129,130}.

La sécurité sanitaire des souches atténuées utilisées pour la vaccination ne fait aujourd'hui plus aucun doute après les centaines de millions de doses de vaccin ayant été administré pendant plus de 50 ans. En effet, depuis 1978 moins de 5000 cas d'effets indésirables considérés comme graves ont été rapportés sur plus de 575 millions de doses distribuées¹³¹. Des épiphénomènes d'infections mortelles ont été rapportés chez des enfants immunodéficients et chez un adulte souffrant du SIDA mais la réversion du vaccin vers une forme pathogène n'a jamais été décrite¹³²⁻¹³⁴. Les vaccins contre la rougeole sont aujourd'hui considérés comme les vaccins humains les plus fiables et les plus sûrs.

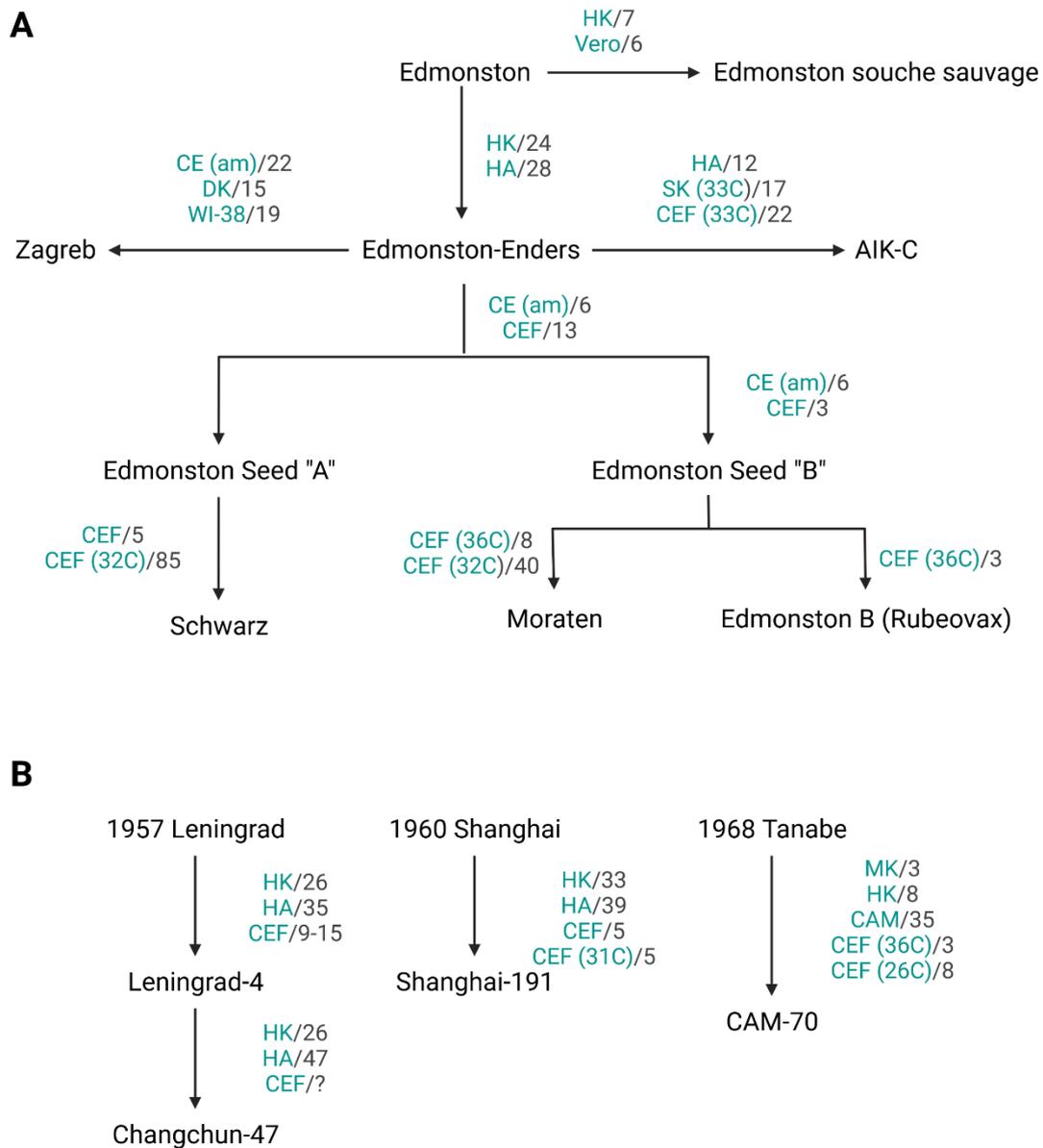


Figure 5 : Génération des différentes souches de MV adapté de « Genetic Characterization of Measles Vaccine Strains »¹²⁶. **A Souches dérivées d'Edmonston. **B** Souches non dérivées d'Edmonston. /Nombre de passages. Abréviations : CAM : cavité chorio-allantoïque d'un embryon de poussin ; CE(am) : cavité intra-amniotique d'un embryon de poussin ; CEF : fibroblaste d'embryon de poussin ; DK : Cellules rénales de chien ; HA : Amnios humain ; HK : Cellules rénales humaines ; SK : Cellules rénales de mouton ; WI-38 : Fibroblastes diploïdes dérivés de tissus pulmonaires fœtaux humains.**

b) Immunogénicité du MV oncolytique

Le MV a la capacité d'activer fortement le système immunitaire de l'hôte afin d'induire la mise en place d'une réponse immunitaire antivirale et par la suite antitumorale. En effet, la mise en place d'une réponse immunitaire joue initialement un rôle essentiel dans les multiples étapes de l'infection et de la maladie provoquée par la souche sauvage du MV. Cette réponse, dans un premier temps de nature innée, se mue progressivement en une réponse adaptative robuste. De nombreuses caractéristiques clefs de cette réaction immunitaire anti-rougeole sont conservées contre les souches atténuées, en faisant des candidats de choix pour la virothérapie oncolytique et la stimulation de l'immunité anti-tumorale¹³⁵.

La réponse innée au MV se traduit par la modification de l'expression d'un sous-ensemble de cytokines et de chimiokines clefs. Dans un premier temps, la réponse innée à une infection par un virus à ARN est généralement dominée par la production par les cellules infectées d'IFN I et III. Les IFN I, principale défense cellulaire antivirale, jouent un rôle essentiel dans l'induction de l'immunité anti-tumorale¹³⁶⁻¹³⁸. Ils stimulent l'activation des macrophages, des DCs conventionnelles et plasmacytoïdes (pDCs), les alertant ainsi de la présence de pathogènes¹³⁹. Par ailleurs, notre équipe a pu montrer que le MV induit l'expression d'IFN- α par les DCs CD1c+ myéloïdes du sang humain et les pDCs. Les IFN- α entraînent par effet autocrine une augmentation de l'expression de la protéine *TNF-related apoptosis-inducing ligand cytotoxique* (TRAIL), transformant les DCs en effecteurs cytotoxiques capables d'induire la mort cellulaire. Ensuite, certaines études suggèrent que les IFN I, en association avec d'autres signaux indiquant la présence de pathogènes, jouent un rôle dans la polarisation des macrophages, favorisant un retour vers un profil moins immunosuppresseur (M2 vers M1)¹⁴⁰. Ils augmentent également les réponses immunitaires adaptatives en favorisant les réponses des LTs *helper* de type 1 (Th1), en renforçant l'expression des molécules du CMH I et en générant une cytotoxicité médiée par les cellules tueuses naturelles (NK : *natural killer*) et LTs¹³⁹. De ce fait, le potentiel adjuvant des IFN I a poussé certaines équipes de recherche à construire des virus oncolytiques codant pour les gènes IFN I. Il a été montré qu'un MV codant pour l'IFN- β permet l'augmentation de l'infiltration des macrophages CD68+, augmentant la survie des souris traitées par rapport aux souris traitées avec un MV non recombinant¹⁴¹. Les IFN de type III sont également considérés pour leurs propriétés antitumorales et immuno-modulatrices.

Notamment, la sécrétion d'IFN de type III à partir de tumeurs transduites a permis d'obtenir des réponses antitumorales contre les tumeurs *in vivo* chez la souris. Ces réponses antitumorales étaient médiées par des neutrophiles, des cellules NK et des LTs CD8+^{142,143}.

Dans un second temps, la réponse innée au MV se traduit également par la modification de l'expression d'un sous-ensemble de protéines inflammatoires, de cytokines et de chimiokines associées à la voie de signalisation NF- κ B et à l'inflammasome. Notamment, Le MV stimule la production de la protéine *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3)*, de l'IL-1 β et de l'IL-18. Ces signaux jouent un rôle central dans l'immunité anti-tumorale en favorisant le homing des cellules NK et des LTs vers le site tumoral, en améliorant leur survie et leur activation vers un profil Th1^{144,145}. Enfin, il a été démontré que l'infection par plusieurs virus dont le MV induit la baisse d'expression de l'IL-10, une cytokine immunosuppressive entraînant entre-autres une polarisation des macrophages et des lymphocytes vers des profils immunosuppresseurs¹⁴⁶.

Dans ce contexte cytokinique, la lyse cellulaire induite par l'infection par le MV est particulièrement immunogène. Notre équipe a beaucoup étudié ce phénomène ces dernières années. Nous avons pu notamment montrer, comme d'autres équipes par la suite, que la mort apoptotique induite par le MV, contrairement à celle induite par irradiation ultra-violettes (UV), permet la maturation des cellules dendritiques, qui sont alors capables de cross-présenter efficacement les antigènes tumoraux phagocytés comme la MSLN ou *New York esophageal squamous cell carcinoma 1 (NY-ESO-1)*, entraînant la prolifération de LT CD8+ spécifiques^{72,131,147}. Par ailleurs, l'activité oncolytique du MV est associée à des phénomènes de fusion cellulaires sous forme de syncytium, observée *in vivo* dans un grand nombre de xénogreffes de cancers humains¹⁴⁸. La mort cellulaire par formation de syncytium, en plus de décupler les capacités de propagation virale, a un très fort potentiel immunogène en favorisant notamment la présentation croisée d'un plus grand nombre d'antigènes tumoraux¹⁴⁹. De plus, la mort des syncytium est associée à des dysfonctions mitochondriales et des voies d'autophagie dont les signaux cellulaires renforcent l'immunogénicité des tumeurs, notamment grâce à la repolarisation des macrophages vers un phénotype antitumoral^{150,151}. De fait, les fonctions fusogéniques du MV sont aujourd'hui considérées comme d'un grand intérêt immuno-adjuvant et plusieurs virus

oncolytiques modifiés génétiquement pour exprimer des protéines fusogéniques sont actuellement à l'étude. Les résultats précliniques dans différents types de tumeurs suggèrent que les virus fusogènes ont le potentiel de surpasser leurs homologues non fusogènes en prolongeant la survie et en induisant une meilleure réponse immunitaire antitumorale¹⁵².

Enfin, l'utilisation du MV en tant que virus oncolytique a pour avantage la possibilité d'insérer des transgènes de grande taille. Certaines études précliniques ont ainsi démontré la supériorité adjuvante des souches codant pour des transgènes immunomodulateurs vis-à-vis de leurs homologues non recombinants, permettant généralement la mise en place d'un infiltrat immunitaire plus important corrélé avec une meilleure survie et une diminution de la taille des tumeurs plus conséquente. Les transgènes les plus couramment étudiés sont résumés dans le **Tableau 1**, adapté de la revue de qualité « Measles Virus as an Oncolytic Immunotherapy » de Christine E. Engeland et Guy Ungerechts⁸⁴.

Ces chercheurs allemands et leur équipe ont beaucoup étudié l'activité oncolytique du MV chez des souris porteuses de mélanome B16 et de cancer du côlon MC38. Ils ont utilisé des MV Schwarz pseudotypé pour reconnaître un récepteur surexprimé comme l'antigène carcinoembryonnaire (CEA : *carcinoembryonic antigen*) ou le CD46, par les cellules tumorales. Ils ont testé différents transgènes immunitaire et ont observé une meilleure efficacité du MV avec l'IL-12 notamment^{153,154}. Cependant leur modèle murin est loin d'être parfait puisque le récepteur du virus est exprimé seulement par les cellules tumorales, ce qui n'est pas le cas chez l'homme où l'expression de CD46 est ubiquitaire.

Transgène	Effet immunomodulateur
GM-CSF	Activation et maturation des DCs et activation des monocytes, macrophages, neutrophiles, NK ¹⁵⁵ .
IFN β 1	Réponse antitumorale améliorée par des mécanismes effecteurs innés et adaptatifs décrits précédemment ¹⁴¹ .
<i>H. pylori</i> NAP	Réponse inflammatoire, promotion des réponses immunitaires polarisées Th1 ¹⁵⁶ .
Anti-CTLA-4, anti-PD-L1	Augmentation des réponses T ⁸³ .
IL-12	Activation et recrutement des LTs et NK ¹⁵⁴ .
IL-15 superagonist	Activation des cellules T et des cellules NK sans induction de l'AICD ni activation des T régulateurs ¹⁵⁷ .
BiTEs	Recrutement de cellules T, amélioration de la cytotoxicité antitumorale des cellules T ¹⁵⁸ .
TAA	Priming et activation des LTs spécifiques au TAA ¹⁵⁹ .

Tableau 1 : effets immunomodulateurs des transgènes retrouvés dans les MV oncolytiques. *GM-CSF* : granulocyte–macrophage colony-stimulating factor, *IFN* : interferon, *NAP* : neutrophil activating protein, *CTLA-4* : cytotoxic T lymphocyte antigen-4, *PD-L1* : programmed cell death 1-ligand 1, *AICD* : activation-induced cell death, *BiTE* : bispecific T cell engager, *TAA* : tumor-associated antigen.

D. OV_s autorisés et Essais cliniques

1. Généralités

Quatre OV_s font l'objet d'une autorisation de mise sur le marché dans divers régions du monde. Le premier est le rigvir, un entérovirus ECHO-7 non pathogène autorisé pour le traitement du mélanome en Lettonie en 2004¹⁶⁰. Cependant, il a été retiré du marché en 2019, suite à un scandale dû à des doses plus faibles de virus que celle annoncée sur le flacon. Le H101, un adénovirus atténué, a été autorisé en 2005 en Chine après avoir démontré des taux de réponse supérieurs en association avec la chimiothérapie par rapport à la chimiothérapie seule chez les patients atteints d'un cancer épidermoïde de la tête et du cou ou de l'œsophage¹⁶¹. Très peu d'informations sur son utilisation en Chine ont été publiées. Le T-VEC (Talimogene laherparepvec, imlygicTM) est le premier OV ayant été approuvé par la FDA et l'*European Medicines Agency* (EMA) pour le traitement du mélanome métastatique en 2015. Il s'agit d'un virus de l'herpès simplex 1 (HSV-1 : *herpes simplex virus 1*), modifié entre-autres pour exprimer le facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF : *granulocyte macrophage colony stimulating factor*)¹⁶². Cependant ce fut un échec commercial, car les inhibiteurs d'ICP mis sur le marché quelques années plutôt ont été préférées par les oncologues. En juin 2021, le G47delta, un HSV-1 oncolytique a obtenu une autorisation temporaire de mise sur le marché au Japon pour le traitement du glioblastome en combinaison avec l'exérèse chirurgicale tumorale. Cette mise sur le marché fait suite à un essai clinique de phase II avec des résultats cliniques prometteurs puisque le virus associé à la chirurgie quadruple la médian de survie des patients par rapport au traitement classique (chirurgie/radiothérapie, chirurgie/chimiothérapie)¹⁶³.

Depuis, d'autres virus oncolytiques ont été ou sont actuellement testés cliniquement en phase III dans différents types de cancers : le pexa-Vec (pexastimogene devacirepvec), un virus de la vaccine étudié dans le carcinome hépatocellulaire en combinaison avec le sorafenib, un inhibiteur multikinase (NCT02562755). Cet essai clinique fut un échec car la combinaison était moins efficace que le sorafenib seul¹⁶⁴. Certains virus ont pu atteindre des essais cliniques de phase III : CG0070, un adénovirus étudié dans le cancer de la vessie (NCT01438112) ; REOLYSIN (pelareorep) un réovirus étudié dans les cancers de la tête et du cou

(NCT01166542) et GL-ONC1 (olvi-Vec : olvimulogene nanivacirepve ou GLV-1h68) un virus de la vaccine atténué par l'insertion de trois transgènes dans ses gènes de virulence, étudié dans les cancers ovariens (NCT05281471).

Une recherche sur le site clinicaltrials.gov réalisée le 24 janvier 2023 liste plus de 230 essais cliniques réalisés ou en cours (mots clefs : *cancer* et *oncolytic*) afin de déterminer le potentiel oncolytique et immuno-adjuvant de nombreux virus contre des cancers solides et hématologiques. De nombreuses questions restent encore en suspens. Parmi elles figurent les modalités d'administration et la sélection des patients afin d'obtenir une réponse thérapeutique effective¹⁶⁵. De plus, beaucoup de ces virus de première génération codent pour le GM-CSF (T-vec, pexa-Vec, CG0070). L'un des enjeux de la virothérapie est donc de trouver des transgènes plus efficaces (l'IL-12 et l'IL-15 notamment). Enfin, une meilleure connaissance des mécanismes de réplifications des OV dans les tumeurs humaines permettraient probablement d'augmenter leur efficacité.

On peut aussi noter que la majorité de ces essais cliniques montrent des résultats prometteurs, particulièrement lorsque le virus est associé à une immunothérapie¹⁶⁶. En effet, l'utilisation des OV apparaît de plus en plus comme une stratégie de support, augmentant fortement l'efficacité d'autres approches thérapeutiques, en particulier l'immunothérapie à base d'inhibiteurs d'ICP. De fait, les combinaisons cliniques les plus avancées sont celles incluant les thérapies ciblant PD-1 et PD- L1¹⁶⁷.

Ainsi, l'utilisation du T-VEC en association avec un anticorps dirigé contre PD-1 était prometteuse, mais cette combinaison n'a montré aucune amélioration significative de la survie sans progression ou de la survie globale dans un essai clinique de phase III chez les patients atteints de mélanome avancé¹⁶⁸. Pourtant cet OV avait permis d'obtenir des résultats particulièrement prometteurs avec le même anticorps dans un essai clinique de phase Ib, laissant espérer un net bénéfice de la combinaison thérapeutique¹⁶⁹⁻¹⁷¹. Les auteurs de cette étude soulignent des différences dans les modalités d'administration de l'OV ainsi qu'un plus grand nombre de patients présentant un stade avancé de la maladie. Par ailleurs, des résultats encourageants ont été obtenus avec l'ipilimumab, un anticorps dirigé contre CTLA4 combiné au T-VEC dans le cadre du mélanome. Il montre une efficacité remarquable

(Taux de réponse globale 39% (T-VEC + ipilimumab) versus 18% (ipilimumab seul); P = 0.002)¹⁷².

2. OV's et MPM

Le MPM est un cancer présentant des propriétés particulières intéressantes pour la virothérapie oncolytique. Tout d'abord, la localisation pleurale permet l'injection intratumorale (IT) des virus ou au moins locale dans la cavité pleurale, méthode actuellement privilégiée dans beaucoup d'études. Ensuite, les patients développent peu de métastases, l'invasion restant le plus souvent locale¹⁷³. Enfin, aucune thérapie ne donne à l'heure actuelle de résultats concluant en termes de survie qui reste aux environs de 12%, 5 ans après le diagnostic.

Bien qu'il s'agisse d'une tumeur maligne peu fréquente, on dispose d'un grand nombre de données précliniques sur les virus oncolytiques dans des modèles murins de MPM. Ces travaux ont progressé jusqu'à des études cliniques pour un petit nombre de virus. En effet, parmi les différentes études cliniques en cours ou réalisées, seulement 6 d'entre-elles concernent le MPM (mots clefs : *mesothelioma* et *oncolytic* (**Tableau 2**). Ce sont des essais de phase 1 et 2 dont une majorité concerne plusieurs types tumoraux. Ils évaluent la tolérance aux virus testés, leur capacité à répliquer dans les tumeurs et non dans les tissus sains ainsi que leur faculté d'induction d'une réponse immunitaire. Ces essais sont récents mais les résultats obtenus à ce jour sont prometteurs. Ainsi, le seprehvir (HSV1716), un HSV-1, démontre un bon profil de sureté avec la preuve d'une réplication virale et de la mise en place d'une immunité anti-tumorale (NCT01721018)¹⁷⁴. De même, le traitement par ONCOS-102, un Adénovirus (Ad5/3) codant pour le GM-SCF, induit une augmentation de l'infiltrat immunitaire avec une augmentation de l'expression de PD-L1 par les lésions tumorales et une polarisation des macrophages tumoraux vers un profil moins immunosuppresseur et plus inflammatoire (M2 vers M1) (NCT02879669)¹⁷⁵.

3. Les essais cliniques du MV

Une recherche sur le site clinicaltrials.gov réalisée le 6 février 2023 liste 16 essais cliniques réalisés ou en cours (mots clefs : *cancer* et *measles*) afin de déterminer le potentiel oncolytique et immuno-adjuvant du MV dans différents types

de cancers solides ou hématologiques (**Tableau 3**). Ce sont principalement des essais de phase 1, parfois 2, évaluant la souche Edmonston Seed B atténuée.

Les essais les plus avancés aujourd'hui concernent deux virus modifiés afin de permettre une surveillance de la réplication virale *in vivo*. Le premier MV oncolytique représenté en clinique est le MV-NIS. Il s'agit d'un MV modifié pour exprimer le gène du symporteur d'iodure de sodium (NIS). La présence de ce transporteur à la surface des cellules infectées par le MV recombinant permet un suivi en temps réel de la réplication virale par tomographie par émission de positons (TEP) ou tomographie par émission monophotonique combinée à une tomographie par ordinateur (SPECT/CT) après injection de radio-isotopes d'iode¹⁷⁶. Ce virus est d'ailleurs en cours d'investigation clinique dans le mésothéliome pleural malin (NCT01503177).

Le deuxième MV le plus utilisé en clinique est le MV-CEA. Ce MV est modifié pour exprimer le domaine N-terminal extracellulaire soluble de l'antigène carcinoembryonnaire humain (CEA : *carcinoembryonic antigen*). Les cellules infectées par le MV-CEA vont excréter le CEA dans l'espace extracellulaire. La mesure des taux de ce marqueur circulant permet un suivi global de la réplication virale¹⁷⁷. Les premiers résultats des études cliniques concernant ces deux virus, peu nombreux encore, démontrent l'excellent profil de sécurité des dérivés oncolytiques du MV Edmonston¹⁷⁸. Par ailleurs, les tests cliniques ont également indiqué une activité biologique prometteuse, avec plusieurs données qui suggèrent la mise en place d'une immunité antitumorale¹⁷⁹⁻¹⁸².

Enfin, une approche à visée immuno-modulatrice est également en cours d'investigation clinique avec l'utilisation du MV-NAP (NCT04521764). Il s'agit d'un MV modifié pour exprimer la protéine d'activation des neutrophiles (NAP : *neutrophil-activating protein*), un facteur de virulence d' *Helicobacter pylori*. La production de cette protéine par les cellules tumorales infectées est capable d'induire des réponses Th1 de la part des LTs et démontre des effets précliniques prometteurs^{183,184}.

Virus	Particularités moléculaires	Phase	N	Administration	Combinaison	Identifiant
Adénovirus (Ad) ONCOS-102	Ad5/3-D24 codant pour le GMCSF	Ib/II	31	Intratumorale	Pémétréxed et Cisplatine	NCT02879669
Virus de la rougeole (MV) MV-NIS	Souche vaccinale Edmonston codant pour NIS	I	15	Intrapleurale	-	NCT01503177 ¹⁷⁸
Virus de l'Herpès simplex 1 (HSV-1) Seprehvir (HSV1716)	Délétion RL1 (ICP34.5)	I/IIa	12	Intrapleurale	-	NCT01721018 ¹⁷⁴
Virus de la vaccine (VV) TBio-6517	Souche Copenhague codant pour FLT3LG, un anticorps ciblant CTLA4 et l'IL-12	I/IIa	138	Intratumorale et Intraveineuse	Pembrolizumab	NCT04301011
Virus de l'Herpès simplex 1 (HSV-1) T3011		I/IIa	74	Intraveineuse		NCT05598268
Virus de la vaccine (VV) GL-ONC1	Souche Lister	Ib	5	Intraveineuse	Eculizumab	NCT02714374

Tableau 2 : propriétés des OV évalués en clinique dans le cadre du MPM. Statuts : [inconnu ou terminé sans résultat](#) ; [En cours](#) ; [Terminé avec résultats](#).

Virus	Cancer	Phase	N	Administration	Combinaison	Identifiant
MV-NIS	Poumon	I	4	Intratumorale	Atezolizumab	NCT02919449
	Ovaire	I/II	57	Cellules souches mésoenchymateuses infectées en intrapéritonéale ou MV seul	-	NCT02068794
	Ovaire	II	66	Intrapéritonéale	-	NCT02364713
	Sein/Tête et cou	I	12	Intratumorale	-	NCT01846091
	Médulloblastome/ Tumeurs rhabdoïdes atypiques récurrentes	I	46	Dans le lit de la tumeur après résection / dans le liquide céphalo-rachidien après ponction lombaire.	Chirurgie	NCT02962167
	Gaine du nerf périphérique	I	30	Intratumorale	-	NCT02700230
	Vessie	I	16	Intravésiculaire	-	NCT03171493
	Myélome multiple	I	2	Intraveineuse	F-18 TFB et imagerie	NCT03456908
	Myélome multiple	I/II	48	Intraveineuse	Cyclophosphamide	NCT00450814 ¹⁸⁵
	Myélome multiple	II	2	Intraveineuse	Cyclophosphamide	NCT02192775
MV-CEA	Mesothéliome	I	15	Intrapleurale	-	NCT01503177
	Ovaire	I	37	Intrapéritonéale	-	NCT00408590 ¹⁸²
	Glioblastome	I	23	Dans la cavité de résection ou autour du lit de la tumeur et/ou intratumorale	Chirurgie	NCT00390299 ¹⁸⁶
MV-NAP	Sein	I	33	Intratumorale	-	NCT04521764
MV mix vaccine	Poumon métastatique	I/II	20	Sous-cutané	Traitement standard	NCT02333474
MV	Poumon	I/II	15	Sous-cutanée	-	NCT00828022

Tableau 3 : propriétés des MV oncolytiques évalués en clinique. Statuts : [inconnu ou terminé sans résultat](#) ; [En cours](#) ; [Terminé avec résultats](#) – **Mix vaccine** : DPT (diphtheria, pertussis, and tetanus), BCG (Bacille Calmette-Guérin vaccine), measles, Serratia and pneumococcus.

3. Sensibilité et résistance des tumeurs aux virus oncolytiques

Les virus exploitent les fonctions de la cellule hôte afin de produire et d'assembler les composants nécessaires à la production de nouvelles particules virales. Les besoins métaboliques et énergétiques nécessaires à leur réplication sont très similaires à ceux des cellules tumorales proliférantes. C'est pourquoi certains virus présentent une capacité naturelle à se répliquer préférentiellement dans les cellules tumorales¹⁸⁷. Par ailleurs, la majorité des recherches et essais réalisés dans le cancer en général et les cancers thoraciques en particulier évalue des OV atténués dont l'activité des facteurs de virulence a été abolie^{166,188}. Cette stratégie assure une spécificité de l'infection aux cellules malignes, dont les défenses antivirales sont très souvent défectueuses, prévenant ainsi une toxicité vis-à-vis des tissus environnants et les effets secondaires associés. De plus, les virus peuvent également être modifiés génétiquement afin de les rendre dépendants des voies cellulaires ou des mécanismes particuliers retrouvés dans les cellules cancéreuses⁶⁴. De ce fait, l'utilisation d'une thérapie à base de virus oncolytiques sous-entend dans un premier temps la compréhension des caractéristiques spécifiques des cellules tumorales régissant leur sensibilisation et leur résistance aux différents virus.

Une tumeur ne consiste cependant pas seulement en une population de cellules cancéreuses hétérogènes. On y retrouve une grande variété de cellules non malignes bordantes, infiltrantes et résidentes dont les fonctions normales sont perverties par le microenvironnement tumoral. On trouve aussi de nombreux facteurs solubles, contenus dans une matrice extracellulaire riche et complexe¹⁸⁹. De plus, lorsqu'une tumeur se développe dans un organe, les tissus sains environnants, dont les mécanismes de défense sont fonctionnels, peuvent limiter l'efficacité des OV. De fait, le poumon est un organe considéré comme l'une des plus importantes interfaces entre l'hôte et son environnement, constamment exposé à de potentiels pathogènes¹⁹⁰. Il possède des mécanismes sophistiqués de défense, notamment contre les virus, susceptibles d'influencer profondément la réponse d'un patient à un OV.

Enfin, la plupart des essais cliniques concernant les virus oncolytiques sont encore hésitants concernant le mode d'administration et sont réalisés après ou en

parallèle d'un traitement, modifiant ainsi le contexte immunitaire et histologique particulier à la tumeur¹⁹¹. Ainsi, le contexte clinique peut largement influencer la sensibilité des tumeurs à l'infection.

De façon générale, même si les nombreux essais cliniques évaluant des OV ne laissent aucun doute sur leur sûreté et leur potentiel thérapeutique contre de nombreux cancers, ils montrent aussi une grande hétérogénéité dans les réponses des patients, particulièrement dans le cadre des cancers thoraciques. L'identification de marqueurs de bon ou de mauvais pronostic afin de définir et d'optimiser l'utilisation des OV et ses associations thérapeutiques est crucial pour la réussite de cette approche. Ces marqueurs pourraient aussi permettre de mieux sélectionner les patients susceptibles de bénéficier de cette approche thérapeutique. Cette partie a donc pour objectif de discuter les mécanismes de sensibilité des tumeurs aux OV et d'identifier les facteurs de restriction cellulaires, tissulaires et physiologiques modulant leur efficacité thérapeutique, particulièrement dans le cadre du MPM et du MV.

A. Interaction des virus avec la cellule tumorale

1. Tropisme

a) Surexpression des récepteurs viraux par les tumeurs

Les cellules tumorales présentent souvent une surexpression de certains marqueurs de surface, dont certains constituent des récepteurs viraux naturels (**Tableau 4**). Ainsi, l'apparition de la mutation N481Y dans le gène codant pour la protéine H chez les souches vaccinales du MV (Edmonston B, Schwarz, Moraten, Zagreb et AIK-C) leur permet d'utiliser la molécule CD46 comme récepteur d'entrée en plus des récepteurs CD150 et nectine-4¹⁹². Le CD46 est une protéine ubiquitaire jouant un rôle de régulateur négatif du système de lyse cellulaire par le complément (CDC : *complement-dependent cytotoxicity*)¹⁰⁷. Cette protéine est retrouvée surexprimée dans de nombreux cancers, dont le MPM, leur permettant ainsi d'esquiver la CDC. Par ailleurs, la découverte récente du CD46 comme moteur métabolique suggère un rôle possible dans la transformation maligne et/ou la prolifération cellulaire¹⁹³. L'entrée du virus augmente progressivement avec la densité de CD46 à la surface d'une cellule. Sa surexpression par les cellules tumorales augmente considérablement leur sensibilité à l'activité oncolytique des souches atténuées du MV^{194,195}.

Par ailleurs, la nectine-4 a également été décrite comme un antigène tumoral dans différents carcinomes comme celui du sein, de l'ovaire et du poumon¹⁹⁶. En revanche, bien que le CD150 soit particulièrement surexprimé par les tumeurs du système nerveux central (glioblastome, l'astrocytome anaplasique, l'astrocytome diffus, l'épendymome... etc.), son expression est essentiellement cytoplasmique¹⁹⁷.

La surexpression des récepteurs viraux par les cellules tumorales témoigne de leur rôle dans les processus de prolifération, d'invasion et d'échappement immunitaire. En effet, la plupart de ces marqueurs sont associés à un pronostic défavorable et l'élimination des cellules les exprimant participe activement à l'effet antitumoral des OV au-delà de la simple oncolyse. Ainsi, l'infection par le MV provoque une baisse d'expression du CD46, exposant les cellules infectées à une lyse par le CDC¹⁹⁸. De plus, il existe un nombre seuil de récepteurs CD46 requis pour la fusion intercellulaire entraînant la mort de toutes les cellules incorporées dans le syncytium⁸⁵. De même, le

médiateur d'entrée des Herpesvirus (HVEM : *herpesvirus entry mediator*), un récepteur d'entrée du HSV-1, est considéré comme un point de contrôle immunitaire inhibant l'action des LTs. L'élimination des cellules exprimant ce marqueur au sein de la tumeur participerait donc au combat contre l'échappement immunitaire^{199,200}.

b) Localisation des récepteurs viraux dans les tumeurs

Certains des récepteurs viraux sont situés dans les jonctions serrées paracellulaires. Ainsi, le récepteur antigénique chimérique (CAR : *chimeric antigen receptor*), la nectine-1, le récepteur 1 de la toxine de l'anthrax (ANTXR1 : *anthrax toxin receptor 1*) ou encore le CD46, se trouvent dans une configuration intercellulaire nécessitant un passage des particules virales dans l'espace jonctionnel^{201,202}. Cette situation peut freiner l'efficacité des OV dans le cadre de tumeurs particulièrement denses. En effet, l'espace entre des cellules tumorales dans le stroma se trouve être particulièrement étroit, avec 20 nm en moyenne²⁰³. Cette distance exclue totalement la diffusion des OV, dont les diamètres sont nettement supérieurs. Cependant, le phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT : *epithelial-mesenchymal transition*), à l'origine des capacités d'invasion des tissus et de formation de métastases des tumeurs et impliquant un remaniement constant de configuration tissulaire, induit la perturbation des jonctions cellulaires, permettent la libération des récepteurs²⁰².

c) Expression des récepteurs viraux par les cellules non tumorales

Une majorité de virus en étude possèdent un tropisme pour de nombreux types cellulaires autres que la cellule cancéreuse (**Tableau 3**). La rétention dans un compartiment cellulaire ou tissulaire non cible, en plus d'engendrer de possibles effets secondaires, peut particulièrement impacter la biodistribution d'un virus oncolytique²⁰⁴. Par exemple, les adénovirus de sérotype 5 interagissent énormément avec différentes cellules sanguines ou certaines cellules immunitaires hépatiques^{205,206}. En effet, près de 90% de la charge virale semble être séquestrée par les cellules de Kupffer et les érythrocytes chez la souris. Une déplétion de ces cellules semble augmenter fortement l'infection au site tumoral²⁰⁷. De la même façon, la capacité du virus de la rougeole à infecter les LTs, LBs ainsi que les DCs et les monocytes provoque une rétention dans les organes lymphoïdes secondaires et dans le sang lorsqu'il est injecté en

intraveineuse (IV)²⁰⁸. En effet, l'atténuation des souches vaccinales altère la capacité de réplication mais ne réduit pas la capacité à infecter les cellules myéloïdes¹³⁵. Néanmoins, il a été montré que la réplication transitoire de la souche vaccinale Edmonston B dans les monocytes sanguins et les macrophages tissulaires modifiés pour exprimer le CD46 humain favorise la mise en place d'une réponse immunitaire anti-rougeole chez la souris. Cette réponse est permise notamment par le titrage des particules virales par les macrophages et monocytes, protégeant ainsi les DCs de l'infection et leur permettant de remplir pleinement leur rôle dans la présentation des antigènes aux lymphocytes^{209,210}.

Récepteur d'entrée	Virus	Tissus sains	Tissus tumoraux
CAR	Ad5 ^{46,47} , Coxsackievirus ⁴⁸	Coeur ⁴⁹ , Cerveau ⁵⁰ , pancréas, intestin, cellules épithéliales et endothéliales ^{51,46}	Surexpression : foie, côlon, vésicule biliaire, œsophage, pancréas, estomac et vulve ²¹¹
CMH I	Ad5 ⁴⁶	Toutes les cellules nucléées ⁵⁴	Tendance à la baisse d'expression ²¹²
CD46	Ad11 ⁵⁷ , MV ^{57,58}	Toutes les cellules nucléées ⁵⁹	Surexpression : sein, Foie, Ovaire ¹⁹³ , Tête et cou ²¹³ , rein ²¹⁴ , mésothéliome ¹⁹³
Nectin-1	HSV-1 ⁵³	Cellules épithéliales et fibroblastes ⁶⁰	Surexpression : foie ²¹⁵ , colon, sein, vessie, pancréas ²¹⁶
HVEM	HSV-1 ⁵³	LT, poumon, foie, reins ⁶¹	Colon, peau, oesophage, estomac, foie, sein, lymphomes, prostate ²⁰⁰
LDLR	VSV ⁶² , Maraba virus MG1 ⁶³	Toutes les cellules ⁶⁴	Surexpression : Sein ²¹⁷
Nectin-4	MV ⁵⁸	Peau, oesophage, placenta, vessie, prostate, glandes salivaires, estomac, cellules endothéliales ^{58,65}	Surexpression : vessie, Tête et cou ²¹⁸ , ovaire ²¹⁹ , sein, pancréas, vessie, colon, peau ²¹⁶
CD150	MV ⁵⁸	LT, LB, NK et DC ⁶⁶	Surexpression : système nerveux central ¹⁹⁷ , prostate, sein ²²⁰
ANTXR1	Seneca Valley virus-001 ⁶⁷	Cellules endothéliales et macrophages ^{68, 69}	Surexpression : estomac, sein, côlon pancréas ²²¹
JAM-A	Reovirus ⁷²	Endothélium, épithélium et leucocytes ⁷³	Surexpression dans presque tous les cancers ²²²
Acide sialique	Reovirus ⁷⁴ , NDV ⁷⁵	Toutes cellules ⁷⁶	Surexpression : gliome, neuroblastome, poumon ²²³
CD155	Poliovirus ⁷⁷	Structures embryonnaires, faiblement exprimé dans la plupart des tissus ^{77,78}	Surexpression : colon, poumon, peau, pancréas, estomac, sein, ovaire ²²⁴

Tableau 4 : Expressions des récepteurs classiques des OV dans les tissus sains et tumoraux. CAR : coxsackievirus and adenovirus Receptor, HSPG : heparan sulfate glycosaminoglycans, CMH I : complexe majeur d'histocompatibilité I, HVEM : herpes virus entry mediator, LDLR : low-density lipoprotein receptor, ANTXR1 : receptor anthrax toxin receptor 1, GAGs : glycosaminoglycans, JAM-A : junctional adhesion molecule-A, Ad : adénovirus, HSV-1 : herpes simplex virus 1, MV : measles virus (virus de la rougeole), VSV : virus de la stomatite vésiculaire, VV : virus de la vaccine, NDV : newcastle disease virus, LT : lymphocyte T, LB : lymphocyte B, NK : cellules natural killer, DC : cellules dendritiques. TCGA : cancer genome atlas program

2. Réponse cellulaires antivirales

Dès la fusion d'une particule virale avec la membrane de la cellule hôte, un ensemble de mécanismes de défenses cellulaires permet le contrôle de l'infection. Face à cela, les facteurs de virulence des virus sont capables de saboter partiellement ou totalement les défenses antivirales de la cellule afin de promouvoir leur réplication. Les souches virales utilisées dans le cadre de la virothérapie oncolytique présentent la plupart du temps des phénotypes atténués par l'inactivation de ces facteurs de virulence, ne permettant plus leur réplication. Dans ce cadre, la perte des fonctions cellulaires antivirales constituent un point majeur de la sensibilité des tumeurs aux OV's atténués. En effet, ces mécanismes, ayant des fonctions antiprolifératives, anti-angiogéniques et pro-apoptotiques, sont souvent défectueux dans les cellules cancéreuses. Leurs défauts les rendent vulnérables à la réplication de virus atténués contrairement aux cellules saines dont les réponses antivirales sont fonctionnelles¹³⁸.

a) Fonctions cellulaires antivirales

a. Reconnaissance du virus

La reconnaissance par la cellule de PAMPs viraux est initiée par différentes familles de récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR : *pattern recognition receptor*), résumés dans la Figure 5. Les PAMPs viraux sont principalement composés d'acides nucléiques tels que l'ARN double brin (ARNdb), l'ARN simple brin (ARNsb) non coiffé et l'ADN cytosolique mais comprennent également certaines protéines membranaires virales. Les cinq classes principales de PRR détectant ces PAMP viraux sont les récepteurs de type Toll (TLR : *toll-like receptors*), les récepteurs de type lectine C (CLR : *C-type lectin receptors*), les récepteurs de type RIG-I (RLR : *RIG-I-like receptors*), les récepteurs de type AIM2 (ALR : *AIM2-like receptors*) et les récepteurs de type NOD (NLR : *nucleotide oligomerization and binding domain*)²²⁵.

Dans un premier temps, les TLRs et les CLR's membranaires sont capables de reconnaître les PAMPs viraux. En effet, les protéines de surface des particules virales peuvent être reconnues au niveau de la membrane cellulaire lors des phénomènes d'adsorption ou de bourgeonnement notamment grâce aux TLR2 et TLR4. Cependant, la reconnaissance du virus par la cellule est principalement déclenchée par la présence d'acides nucléiques. Ainsi, au niveau des endosomes, le TLR3 reconnaît les

ARNdb, le TLR 7 et 8 les ARNsb et le TLR9 les motifs cytosine–phosphate–guanine (CpG) non méthylés de l'ADN. Ces trois derniers TLRs sont exprimés exclusivement par les cellules immunitaires, notamment les cellules dendritiques. Les autres sont exprimés par différents types cellulaires, notamment les cellules épithéliales des muqueuses. Alors que les CLR sont principalement impliqués dans la capture d'antigènes par les cellules présentatrices d'antigènes, les TLRs ont un réel rôle d'alarme. Leur activation induit l'expression de cytokines inflammatoires et antivirales notamment via la réponse primaire de différenciation myéloïde 88 (MyD88 : *myeloid differentiation primary response 88*) et l'adaptateur contenant un domaine TIR et induisant l'interféron- β (TRIF : *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*)^{226,227}.

La reconnaissance des ARN viraux cytosoliques est réalisée principalement par les hélicases de la famille des RLRs, exprimées dans tous les types cellulaires, spécialisées dans la reconnaissance des virus à ARN. *Retinoic acid inducible gene 1* (RIG-I) et *melanoma differentiation associated gene 5* (MDA-5) reconnaissent les ARNdb²²⁸. Contrairement à RIG-I et MDA-5, l'hélicase cytosolique *laboratory of Genetics and Physiology 2* (LGP-2), également de la famille des RLRs, reconnaît l'ARNdb mais agit comme un régulateur négatif des autres RLRs²²⁹. De même, de nombreuses études décrivent *DEAD-box polypeptide 3, X-linked* (DDX3), une autre hélicase cytosolique, comme un capteur d'ARN viral dont l'activation entraîne des cascades de signalisation antivirales²³⁰. Les membres de la famille des NLRs, notamment NOD2, sont également impliqués dans la reconnaissance d'ARNsb viraux²³¹.

La reconnaissance des ADN viraux cytosoliques est réalisée par un grand nombre de molécules différentes d'expression ubiquitaire. Ainsi, plusieurs membres de la famille des ALRs tels qu'AIM2, IFI16, PYHIN1, MNDA et DAI, sont caractérisés par un domaine de liaison à l'ADN leur permettant de réagir à la présence d'ADN viral²³². De même, d'autres senseurs cytosoliques, comme la polymérase III, *cGAMP Synthase* (cGAS) et *LRR Binding FLII Interacting Protein 1* (LRRFIP1) sont de plus en plus décrits pour leur rôle de détection des ADNdb viraux. Les récepteurs NLRs et ALRs activés conduisent à la sécrétion de cytokines inflammatoires et antivirales via la voie NF- κ B et la voie du facteur de régulation des interférons 3 (IRF3 : *interferon regulatory*

factor 3), mais aussi à l'activation de l'inflammasome et de la caspase 1, entraînant une mort cellulaire inflammatoire par pyroptose^{226,233}.

Ensuite, des signaux de danger indépendants des PAMPs viraux peuvent être impliqués dans les mécanismes de détection de l'infection virale. Notamment, les phénomènes de fusions membranaires, même s'ils ne sont pas limités au contexte infectieux, sont considérés comme des signaux de danger²³⁴. La détection d'une présence virale par ces différents mécanismes induit l'activation de différentes voies de signalisation convergeant vers l'expression de cytokines pro-inflammatoires et antivirales.

Enfin, une cellule peut également répondre à la présence de DAMPs induite par la lyse virale de cellules adjacentes. Les principaux DAMPs libérés lors d'une infection virale, décrits précédemment, sont la CALR, HMGB1, l'ATP et les HSP. Les HSP et HMGB1 peuvent être reconnues par les TLR2 et TLR4 membranaires, entraînant des voies de signalisation pro-inflammatoires et antivirales. HMGB1 peut également activer des récepteurs RAG membranaires, dont la voie de signalisation conduit à l'expression de cytokines inflammatoires via l'activation de NFκB²³⁵. Les HSP, tout comme la CALR, peuvent également être reconnues par la protéine 1 liée au récepteur des lipoprotéines de basse densité (LRP1 : *low density lipoprotein receptor-related protein 1*), aussi appelé CD91, à la surface des cellules présentatrices d'antigènes, induisant de même l'activation de la voie NF-κB mais aussi l'activation de ces cellules²³⁶. La CALR agit alors comme un signal « eat-me » à la surface des cellules tumorales mortes pour qu'elles soient phagocytées. La présence d'ATP dans le milieu extracellulaire peut enfin être détectée par les récepteurs P2X7 et P2Y2, promouvant l'expression de cytokines inflammatoires²³⁷.

Pour conclure, la reconnaissance de l'ensemble des signaux des PAMPs et des DAMPs, reconnus par la cellule en association avec le contexte cytokinique, orchestre une symphonie particulière permettant une fine adaptation de la réponse cellulaire et immunitaire au danger.

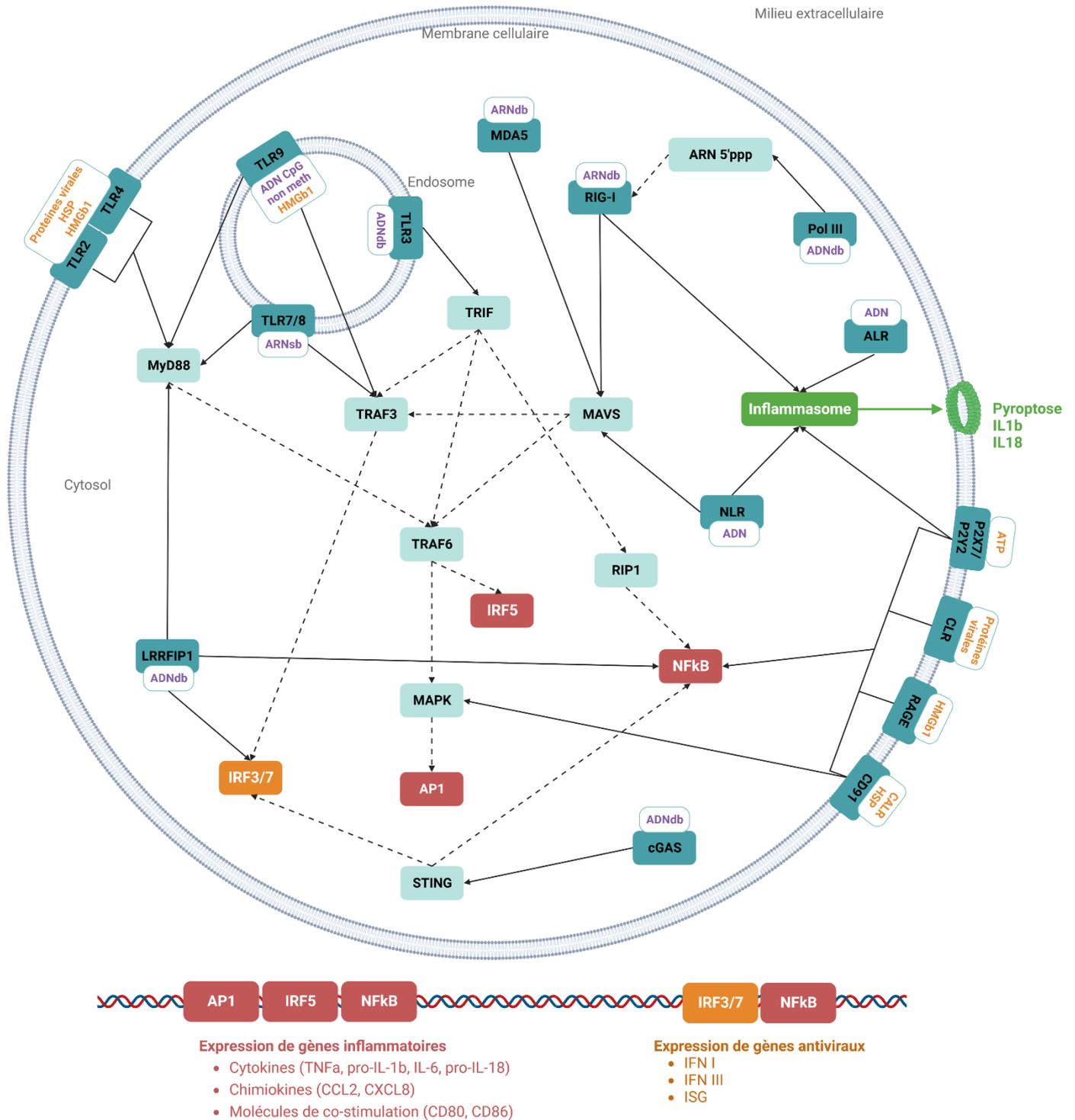


Figure 5 : Reconnaissance des virus par les PRRs. La reconnaissance membranaire, endosomale et cytosolique des molécules virales par les PRRs active des voies antivirales IFN I, IFN III et l'expression de gènes stimulés par les IFN (ISG : *Interferon stimulated genes*) à travers les facteurs de transcription IRF3 et IRF7. En parallèle, l'activation des PRRs permet aussi l'induction des voies de signalisation engageant les facteurs de transcription AP1, IRF5 et NF- κ B. Ces voies aboutissent à l'expression de cytokines pro-inflammatoires et à la mise en place de l'inflammasome^{131,217,232-234}.

b. Les réponses IFN antivirales

Ce sont les cytokines solubles et particulièrement les IFN, par leurs actions auto et paracrines, qui mettent en branle et propagent les défenses antivirales. Même si les IFN II jouent un rôle protecteur auxiliaire non redondant permettant de contrôler la pathogénie de certains virus, ce sont essentiellement les IFN I et III qui assurent la mise en place d'une réponse antivirale effective²³⁸.

La réponse IFN I

Les IFN I sont un groupe de cytokines immunomodulatrices codées au niveau de la cytobande 9p21.3. Ces gènes codent chez l'humain pour treize types d'IFN I fonctionnels : l'IFN α (*IFNA1*, *IFNA2*, *IFNA4*, *IFNA5*, *IFNA6*, *IFNA7*, *IFNA8*, *IFNA10*, *IFNA13*, *IFNA14*, *IFNA16*, *IFNA17* et *IFNA21*), l'IFN ω (*IFNW1*), l'IFN ϵ (*IFNE*), l'IFN κ (*IFNK*) et l'IFN β (*IFNB1*), ainsi que 11 pseudogènes IFN²³⁹. L'expression de ces gènes est induite par la fixation des facteurs de transcription IRF3, IRF7 et NF- κ B. Leur translocation nucléaire a lieu suite à l'activation de voies de signalisation dépendantes des PRRs principalement suite à la détection d'une infection virale. La voie de signalisation des IFN I est médiée par le récepteur de l'IFN- α et IFN- β (IFNAR : *interferon- α/β receptor*).

Cette voie de signalisation mène à la transcription de plus de 300 gènes stimulés par les IFN (ISG : *IFN stimulated genes*) (Figure 6)²⁴⁰. Les activités des ISGs sont multiples. Principalement antiviraux, ils interfèrent avec toutes les phases du cycle de vie des virus, se concentrant particulièrement sur les étapes cruciales de traduction, d'assemblage et de sortie²⁴¹. Certains ISGs participent aussi à l'amplification de la réponse antivirale ou à sa résolution²⁴². La compréhension de l'ensemble de leurs modes d'action est encore aujourd'hui un des enjeux de la recherche en immunité innée.

La réponse IFN I constitue le principal moyen de défense cellulaire face aux infections virales. Ainsi, des souris dépourvues du récepteur IFNAR développent généralement des infections multiples dans la journée suivant l'exposition à des virus qui ne sont pas pathogènes chez les souris ayant un récepteur IFNAR fonctionnel²⁴³. Chez l'homme, les anomalies génétiques touchant la voie de signalisation IFNAR sont rares et mortelles²⁴⁴.

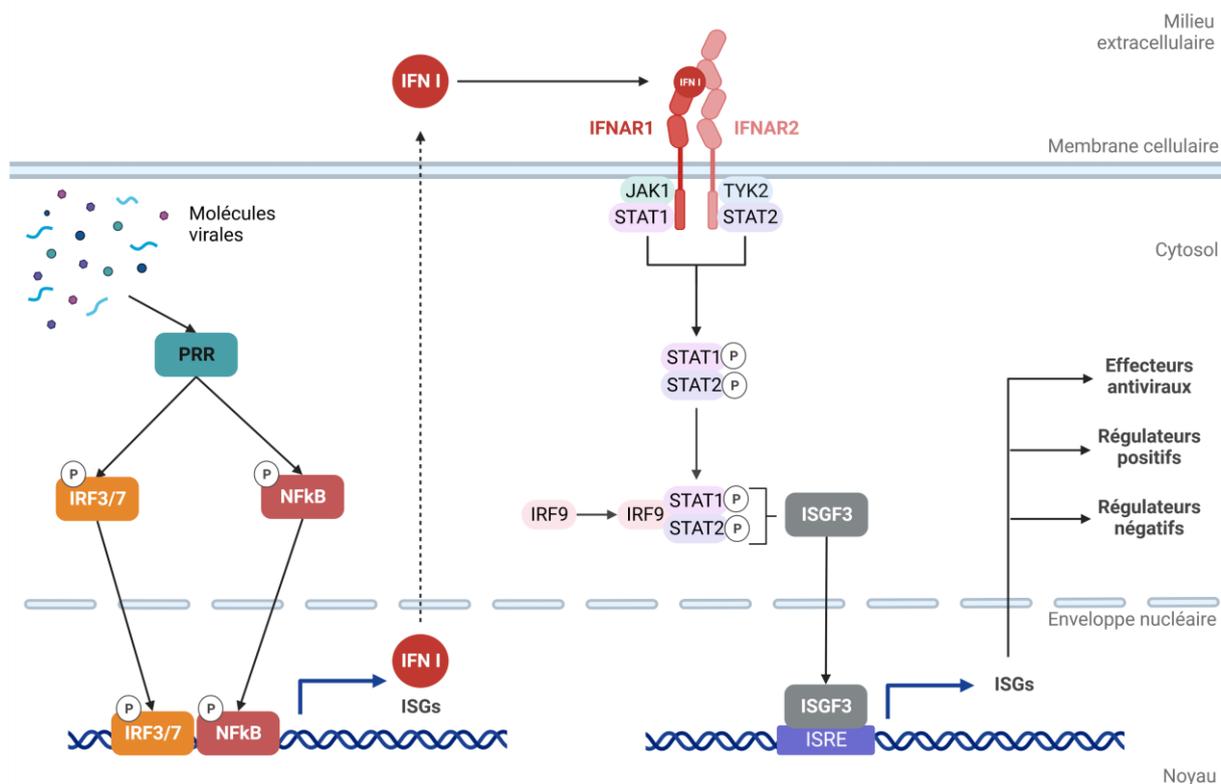


Figure 6 : la réponse IFN I, d'après Schneider et al. ²⁴². Les PRRs membranaires, endosomiaux et cytosoliques reconnaissent les molécules virales sous forme de protéines ou d'acides nucléiques. Les signaux de ces PRRs induisent l'activation des facteurs de transcription IRF3, IRF7 et NF- κ B qui transloquent alors vers le noyau. Ils se lient à des promoteurs spécifiques et les activent, déclenchant l'expression des IFN I ainsi que celle d'un sous-ensemble d'ISGs. Les IFN I ont une action auto et paracrine par fixation sur leur récepteur IFNAR, induisant la phosphorylation des protéines *janus associated kinase 1* (JAK1) et *tyrosine kinase 2* (TYK2). Ces kinases vont à leur tour phosphoryler le récepteur, entraînant la phosphorylation des protéines *signal transducer and activator of transcription 1 et 2* (STAT1 et STAT2). Ces protéines phosphorylées, associées à IRF9, formeront le complexe *ISG Factor 3* (ISGF3). La fixation de ce complexe sur les sites présentant des éléments de réponse stimulés par les IFN (ISRE : *interferon-stimulated response element*) du génome induit l'expression d'un large spectre d'ISG.

La réponse IFN III

Les IFN III sont également des cytokines antivirales dont les fonctions sont similaires à celles des IFN I. Elles comptent parmi elles quatre molécules : l'IFN- λ 1, l'IFN- λ 2 et l'IFN- λ 3 aussi appelées IL29, IL28A et IL28B et l'IFN- λ 4²⁴⁵.

L'expression de ces cytokines est induite, par la reconnaissance des molécules virales par les PRRs. L'engagement des PRRs initie comme pour les IFN I une réponse transcriptionnelle antivirale par le biais des facteurs de transcriptions NF- κ B, IRF3 et IRF7. Les IFN III sont donc co-exprimés avec les IFN I, mais leur cinétique

d'expression est retardée, notamment celle de l'IFN- λ 2 et l'IFN- λ 3 dépendante du seul facteur de transcription IRF7. En effet, ce facteur de transcription n'est présent de manière basale que dans certains types cellulaires immunitaires (pDCs), et est induit dans les autres types par les IFN I²⁴⁶.

Le récepteur des IFN III est composé de deux chaînes : l'IFN- λ R1 ou IL28RA et IL-10R2 ou IL-10R β . La liaison d'une des quatre molécules IFN III au récepteur entraîne l'activation des tyrosines kinases *janus associated kinase 1* (JAK1) et *tyrosine kinase 2* (TYK2) associées au récepteur, engageant la même voie de signalisation que les IFN I. Les deux types d'IFN antiviraux induisent donc des réponses transcriptionnelles très similaires^{247,248}. Néanmoins, les IFN III, comme les IFN β , ne sont pas affectés par la boucle de rétro-inhibition médiée par l'activation d'IFNAR2 et la protéine Usp18 qui inactive les IFN α . Ainsi, ils génèrent des réponses antivirales prolongées²⁴⁹. Par ailleurs, contrairement aux autres facteurs IFN, tous les types cellulaires ne répondent pas pleinement à l'IFN- λ car l'expression de leur récepteur n'est pas ubiquitaire comme IFNAR²⁵⁰. L'équipe a d'ailleurs montré que les lignées de MPM permissives à la réplication du MV produisait des IFN de type III²². Des données non publiées montrent que le manque d'activité antivirale des IFN III peut s'expliquer par la faible expression de son récepteur à la surface des lignées de MPM.

c. La signalisation pro-inflammatoire

Inflammasome, IL-1 et IL-18

Les inflammasomes sont des structures cytosoliques contribuant aux réponses antivirales. Jurg Tschopp a été le premier à les identifier en 2002²⁵¹. Leur structure consiste en un assemblage oligomérique d'une protéine de détection, d'un adaptateur, la protéine de type speck associée à l'apoptose contenant un domaine CARD (ASC : *apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD*) et d'un effecteur, la pro-caspase 1²⁵². Actuellement, il a été démontré que cinq types d'inflammasomes sont impliqués dans l'immunité antivirale : l'inflammasome NLRP3, l'inflammasome RIG-I, l'inflammasome MXA (*myxovirus resistance protein 1*), l'inflammasome IFI16 (*Gamma-interferon-inducible protein*) et l'inflammasome AIM2 (*absent in melanoma 2*)^{253,254}.

L'activation des inflammasomes est un processus en deux étapes, décrites dans la **Figure 7**. Ces complexes de l'immunité innée constituent un élément clef du système antiviral. De fait, leur activation par la détection de molécules virales entraîne la maturation des cytokines IL-1 β et IL-18 inflammatoires ainsi le déclenchement de la mort cellulaire pyroptotique.

Le principal rôle de l'IL-1 β est l'engagement des voies de signalisation permettant l'expression d'autres cytokines et chimiokines, amplifiant la réponse inflammatoire, recrutant et activant les cellules immunitaires²⁵⁵. Ainsi, dans les cellules épithéliales humaines infectées par le virus de la varicelle, le blocage du récepteur de l'IL-1 β , l'IL-1R1, empêche la régulation à la hausse des cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines telles que l'IL-6, l'IL-8 et CXCL2, mais n'a eu aucun effet sur la production d'IFN I, l'expression des ISGs ou la réplication du virus. Un rôle antiviral direct de l'IL-1 β a cependant récemment été décrit dans différents types cellulaires.

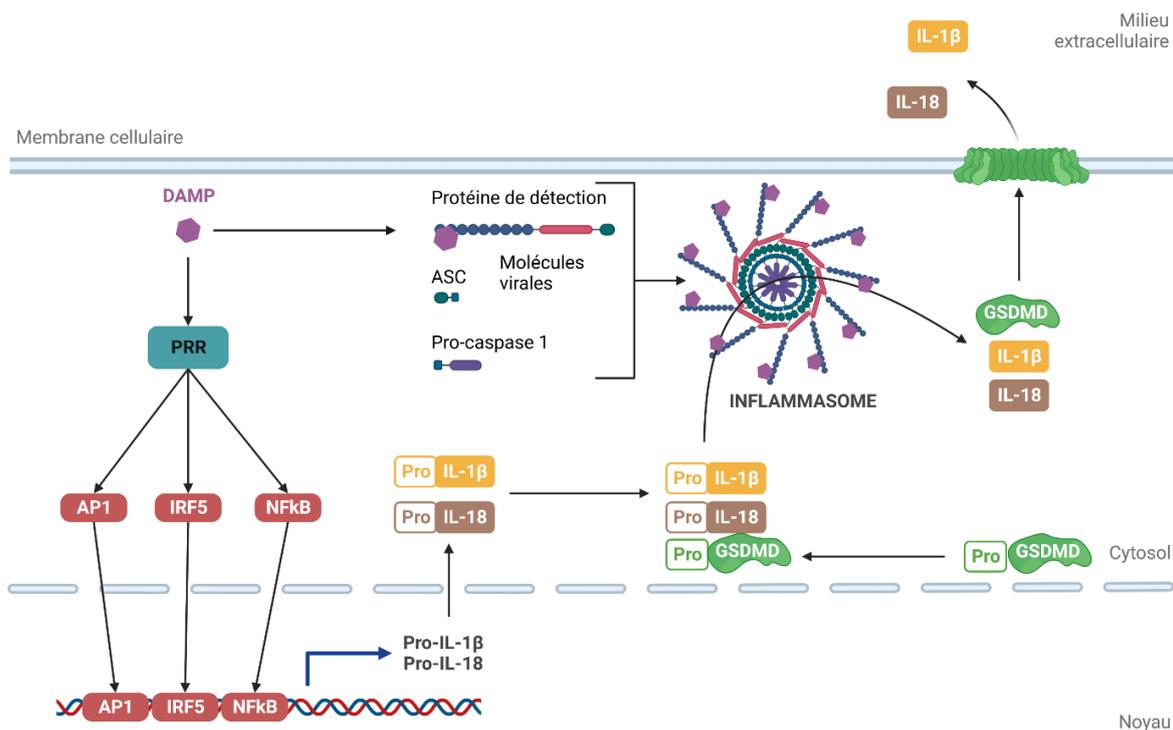


Figure 7 : mise en place de l'inflammasome suite à une infection virale. Dans un premier temps, l'activation des PPRs par les molécules virales va entraîner la transcription des cytokines IL-1 β et IL-18 immatures. En parallèle, une des protéines de détection (NLRP3, RIG-I, MxA, IFI16 ou AIM2) va reconnaître les DAMPs associés aux virus et va s'organiser en un complexe protéique avec la protéine ASC et la pro-caspase 1. La pro-caspase-1, prise dans ce complexe, est convertie en caspase-1 active par autoprotéolyse. La caspase-1 activée transforme la pro-IL-1 β et la pro-IL-18 en leurs formes actives, IL-1 β et IL-18. Elle active également par clivage la gasdermine D (GSDMD), une protéine formant des pores membranaires, provoquant la fuite du contenu cytosolique ainsi que la mort cellulaire par pyroptose^{256,257}.

En effet, sa présence induirait la production d'IFN I et d'ISGs antiviraux, notamment dans les cellules myéloïdes, à travers l'activation de la voie MyD88/NF- κ B²⁵⁸. Par ailleurs, l'IL-1 β active IRF3 dans des astrocytes fœtaux humains *in vitro*, induisant l'expression d'IRF7 et d'IFN- β ²⁵⁹. Enfin, certains auteurs ont pu montrer que l'IL-1 β produite par des kératinocytes *in vitro* est capable d'induire directement la production d'ISGs par des fibroblastes via l'activation de la signalisation JAK/STAT²⁶⁰.

Le principal rôle de l'IL-18, anciennement connue sous le nom de facteur d'induction de l'IFN γ , est l'activation de la réponse des LTs Th1. En effet, sa voie de signalisation permet l'induction de la production d'IFN γ dans les LTs et les cellules NK. Par ailleurs, l'IL-18 induit l'expression du TNF- α , de l'IL-1 β , du ligand Fas et de plusieurs chimiokines par l'activation du facteur de transcription NF- κ B²⁶¹. Le rôle antiviral indirect de l'IL-18, par l'induction de réponses T, a été décrit contre de nombreux virus, notamment le virus Ectromelia, le HSV et les rotavirus²⁶².

Autres Cytokines pro-inflammatoires

De nombreuses autres cytokines sont connues pour jouer un rôle dans la défense de l'hôte contre les infections virales. Parmi elles, TNF- α est classiquement décrit aux côtés des IFN I dans les infections virales pour ses activités antivirales directes. Il prévient notamment la réplication de nombreux virus *in vitro*, comme le virus de la grippe A, de la stomatite vésiculaire, de l'encéphalomyocardite et le virus de l'herpès simplex de manière dose-dépendante, prévenant le développement de leurs effets cytopathiques^{263,264}. D'un autre côté l'IL-2, l'IL-6, l'IL-12 et l'IL-13 contribueraient à la réponse antivirale indirecte par leur capacité à moduler divers aspects de la réponse immunitaire adaptative, jouant un rôle dans le recrutement et l'activation de cellules immunitaires capable de réguler l'infection virale²⁶⁵.

b) Mutations des voies antivirales dans les tumeurs

a. Mutations favorables à la réplication virale

Les cellules en cours de transformation tumorale subissent un processus d'immuno-édition consistant en une élimination sélective par le système immunitaire de l'hôte. La pression constante du système immunitaire pour éliminer efficacement la tumeur va paradoxalement participer à la sélection darwinienne de variants moins

immunogènes. Cette sélection aboutit à la formation d'une masse tumorale immuno-résistante, proliférant activement sans restriction²⁶⁶.

Lors de ce processus d'immuno-édition tumorale, les réponses antivirales sont souvent altérées. Ces réponses ont la capacité de promouvoir l'élimination de cellules tumorales par les cellules de l'immunité adaptative, en particulier par les cellules NK et LTcs. Elles possèdent cependant des fonctions antiprolifératives, anti-angiogéniques et pro-apoptotiques qui sont incompatibles avec un développement tumoral^{138,267,268}. Ainsi, il a été montré que le développement syngénique de sarcomes immunogènes chez des souris déficiente en rag2 (sans lymphocytes) n'était possible qu'avec un blocage du récepteur aux IFN I. De même, les souris *knock out* pour ce récepteur étaient plus sensibles à la formation de tumeurs induites par des carcinogènes²⁶⁹. Différentes mutations de la voie IFN I et III ont été rapportées dans les tumeurs.

Tout d'abord, la perte hétéro ou homozygote de la région p21 du chromosome 9 portant le cluster des gènes IFN I (9p21.3). Ainsi, une vaste méta-analyse de données individuelles de 9937 patients obtenues à partir de cBioportal indique que la délétion d'au moins une copie des gènes IFN I est prévalente pour les cancers de la peau (69 %), du poumon (63 %), de l'œsophage (61 %), du pancréas (53 %) et du MPM (51 %) ²⁷⁰. Par ailleurs, notre équipe a montré la proximité du locus codant les IFN I avec le gène codant pour *CDKN2A*, un suppresseur de tumeur souvent délété dans les cancers. Sur une biocollection de 78 cultures primaires de MPM, en collaboration avec le Dr Didier Jean du centre de recherche des Cordeliers, nous avons mesuré que les co-délétions homozygotes de *CDKN2A* et des gènes IFN I sont retrouvées chez 23% de patients souffrant de MPM²⁶⁷. Récemment, une équipe a mis en place la technique MACHETE qui permet de déléter les deux copies de larges régions génomiques dans les cellules tumorales²⁷¹. Cela leur a permis de montrer que la co-délétion des gènes IFN I et de *CDKN2A* dans une lignée murine de cancer du pancréas favorise l'évasion immunitaire, les métastases et la résistance à l'immunothérapie par rapport à la lignée où seul *CDKN2A* est délété.

D'autres mutations engendrant des pertes de fonction de la voie IFN I sont retrouvées. On retrouve parmi elles l'épissage alternatif d'*IRF3* abrogeant ses fonctions²⁷², la mutation ou sous-expression de *STAT1*²⁷³ et la perte d'*IRF9/p48*²⁷⁴.

Notre équipe a également pu mettre en évidence que l'expression de certains sous-ensembles d'ISGs est parfois altérée dans le cadre du MPM²².

La virothérapie oncolytique tire avantage de cet environnement immunosuppresseur car il est favorable à la réplication des virus. Par exemple, le génome du MV code pour deux protéines accessoires dites de virulence, V et C, jouant un rôle antagoniste de la réponse IFN I²⁷⁵. Les souches sauvages du virus de la rougeole sont naturellement capables, grâce aux actions de ces gènes, de contrecarrer cette réponse antivirale¹²⁸. Notre équipe a pu montrer que la souche atténuée Schwarz du MV est sensible aux IFN I, contrairement à la souche sauvage^{22,276}. Cette sensibilité est notamment due à des mutations du gène codant pour les protéines V et C et à la présence de particules virales défectives interférentes détectables par RIG-I et MDA-5^{128,277,278}. D'autres virus oncolytiques, comme le VSV, le NDV, le VV, le HSV-1, les réovirus, le Sindbis virus, les adénovirus et le virus de Sendai sont naturellement sensibles à la réponse IFN I ou présentent des mutations au niveau de leurs gènes de virulence, liées aux processus d'atténuation²⁷⁹. Ces mutations les privent de leurs capacités antagonistes de la réponse IFN I. Ainsi, ces OV's ne sont plus capables de se répliquer dans les cellules saines, mais le font aisément dans les cellules tumorales dont la réponse IFN I est défective.

b. Mutations défavorables à la réplication virale

Toutes les tumeurs et toutes les cellules tumorales à l'intérieur des tumeurs ne portent pas de mutations inactivant les voies antivirales. Au-delà de l'expression classique de ces gènes par certaines tumeurs, la régulation à la hausse de la signalisation de l'IFN a été signalée dans un certain nombre de tumeurs, notamment les cancers de l'ovaire, du pancréas, du MPM et du mélanome²⁸⁰. La méta-analyse des données de 9937 patients obtenues à partir de cBioportal citée précédemment indique notamment une proportion de mutations de type gain/amplification du cluster de gènes codant pour les IFN I, notamment pour les cancers de l'ovaire (22%), colorectal (20%) et de la vessie (20%). En ce qui concerne le MPM, cette proportion est faible (1,5%)²⁷⁰.

De même, il a été montré que certaines cellules tumorales peuvent présenter une activation chronique de gènes antiviraux, responsable de résistances aux OV's. Le groupe du Dr Stephen J Russell et du Dr Evanthia Galanis a lancé des essais cliniques

d'immunothérapie oncolytique à base de MV dans plusieurs cancers différents. Ils ont rapporté dans des modèles précliniques de gliome et dans un essai clinique de phase I qu'une signature IFN I élevée dans la tumeur, caractérisée par une forte expression de plusieurs ISGs, est un marqueur pronostique de l'inefficacité du MV²⁸¹. Ils ont ensuite montré *in vitro* que cette signature IFN I constitutive présente dans les lignées cellulaires tumorales résistantes peut être réduite par un traitement avec le ruxolitinib, un inhibiteur de JAK1/2 qui inhibe la signalisation IFNAR. Ce traitement a permis de surmonter la résistance et de rendre les lignées cellulaires tumorales permissives à la réplication du MV. Dans d'autres études, l'analyse RNA-seq de cellules de mélanomes résistantes au VSV sauvage et au virus Sindbis a révélé de larges changements dans l'expression des ISGs, même en l'absence de virus^{281,282}.

Cette activation chronique peut notamment être due à la présence d'ADNdb dans le cytoplasme provenant de fuites mitochondriales, couramment retrouvées dans les cancers, et activant la voie cGAS/protéine stimulatrice des gènes IFN (STING : *stimulator of IFN genes*)^{283,284}. Elle peut aussi être causée par l'expression de rétrovirus endogènes dans les cellules tumorales sous forme d'ARNdb qui activent la voie RLR/Protéine de signalisation antivirale mitochondriale (MAVS : *Mitochondrial antiviral-signaling protein*)^{285,286}. Enfin, la signalisation IFNAR des cellules tumorales peut être activées par les IFN I des cellules phagocytaires produits en réponse aux cellules tumorales nécrotiques²⁸⁷. Parmi les lignées de MPM de l'équipe, l'une d'entre elles, Meso4, expriment constitutivement des IFN I et des ISGs. Cette lignée est résistante à la réplication du MV et peut être rendue permissive par un traitement au ruxolitinib²².

En ce qui concerne les signaux inflammatoires et les inflammasomes, leur rôle dans la tumorigénèse reste très controversé. Même si l'inflammation chronique présente dans le microenvironnement reste l'une des principales caractéristiques du cancer, son impact sur la progression tumorale est ambigu. Les inflammasomes et cytokines inflammatoires peuvent à la fois promouvoir et supprimer le développement tumoral en fonction du types de tumeurs, mais aussi du type d'inflammasome impliqué et des molécules effectrices en aval^{144,288}. En ce qui concerne le MPM, il s'agit d'un cancer particulièrement inflammatoire, car son processus de tumorigénèse est principalement induit par l'inflammation chronique causée par la présence de fibres d'amiante²⁸⁹. En effet, cette inflammation chronique favorise la dérégulation de la

réparation des dommages à l'ADN, la fibrose et l'EMT. L'une des voies inflammatoires activées par l'amiante est entre-autres celle de l'inflammasome de type NLRP3²⁹⁰. Au-delà des fonctions antivirales directes des cytokines inflammatoires et des inflammasomes, qui sont encore très peu décrites, le microenvironnement tumoral peut répondre à cette inflammation chronique. Il peut tout d'abord agir directement contre les particules virales, mais surtout il peut potentiellement produire des IFN I face aux signaux inflammatoires, pré-activant les défenses antivirales des cellules tumorales et leur conférant une résistance aux OV^s²⁹¹. Dans ce contexte, notre équipe a notamment pu montrer que le Ruxolitinib, un inhibiteur de la signalisation JAK1/2, inhibe la voie de signalisation IFN I dans des lignées de MPM, potentialisant l'effet oncolytique du MV²².

3. Cycle cellulaire, métabolisme

La capacité des cellules tumorales à se diviser sans restriction implique des modifications des voies du cycle cellulaire et des voies métaboliques promouvant une division cellulaire intense, particulièrement favorables aux infections virales. En effet, les virus exploitent les fonctions de la cellule hôte afin de produire et d'assembler les composants nécessaires à la production de nouvelles particules virales. Les besoins métaboliques et énergétiques nécessaires à leur réplication sont très similaires à ceux des cellules tumorales proliférantes¹⁸⁷. Néanmoins, les cellules tumorales ont également une capacité de mise en dormance face au stress cellulaire. Les cellules cancéreuses dormantes prolifèrent moins vite voir pas du tout, présentant des propriétés de cellules souches et/ou de sénescence. Ce mécanisme d'échappement tumoral met en place un état métabolique et des voies de signalisation qui sont particulièrement défavorables à la réplication virale²⁹².

a) Cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est défini comme le processus correspondant à la vie d'une cellule, depuis sa formation par division de la cellule mère jusqu'à la fin de sa propre division en deux cellules filles²⁹³. Ce cycle est divisé en deux parties fondamentales : la Mitose et l'Interphase. La Mitose correspond à la séparation des chromosomes filles (Prophase, Prométaphase, Métaphase, Anaphase et télophase) et se solve par la division cellulaire (cytokinèse). Cette étape, bien qu'étant la plus spectaculaire du

cycle, est très courte. En effet, environ 95 % du cycle cellulaire se déroule en Interphase, c'est-à-dire la période entre les mitoses. L'interphase est divisée en quatre phases différentes. Tout d'abord la phase G1 (Gap1) correspond à l'intervalle entre la Mitose et l'initiation de la réplication de l'ADN. La cellule est active sur le plan métabolique, croît et met en œuvre ses fonctions spécifiques. Cette phase est considérée comme l'état basal d'une cellule et peut durer indéfiniment, dans un état de quiescence ou phase G0 (Gap0). Lors de la quiescence, la cellule est active métaboliquement mais ne progresse plus dans son cycle. Ensuite, lors de la phase S (synthèse), la cellule réplique son ADN. Enfin, la phase G2 (Gap2) permet de préparer la mitose en terme de croissance et de synthèse protéique²⁹⁴(Figure 8).

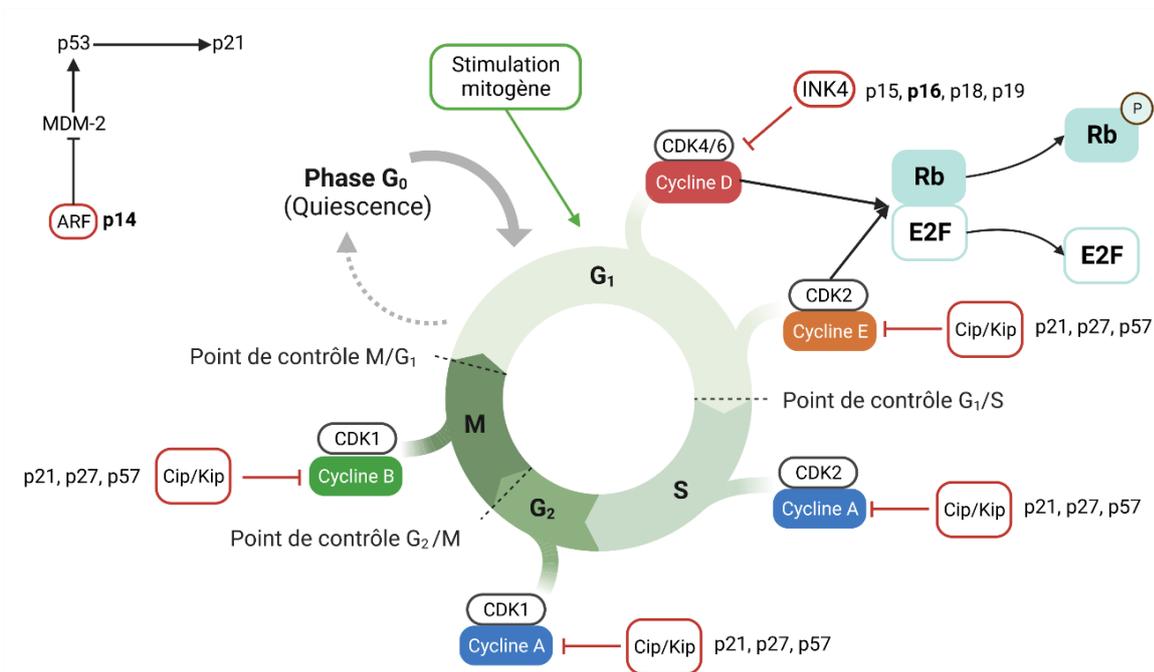


Figure 8 : régulation du cycle cellulaire d'après Lucia C. Leal-Esteban et al²⁹⁵. Le cycle cellulaire comprend les phases suivantes, G1 (Gap1), S (Synthèse de l'ADN), G2 (Gap2) et M (Mitose) qui sont contrôlées par les régulateurs du cycle cellulaire. Les cellules quiescentes sortent de la phase G0 après une stimulation mitogène qui induit la production de cycline D, qui pourra s'associer les CDK4/6. Ces complexes s'accumulent durant la phase G1, entraînant la phosphorylation de la protéine Rb qui libère le facteur de transcription E2F. Ce facteur déclenche la transcription critique de gènes nécessaires à la mise en route irréversible de la phase S, dont la polymérase, Cycline E et la Cycline A. Les complexes Cycline E-CDK2 deviennent actifs et continuent à hyperphosphoryler la protéine Rb. L'activation de CDK2 par la Cycline A permet la transition en phase S. La phase G2 se caractérise par l'association de la cycline A et de CDK1. La Cycline B active enfin CDK1, permettant une entrée en mitose. Lors du cycle, l'activation et la fonction des différents complexes CDK/cyclines sont négativement régulées par les familles de CDKs INK4 (p15, p16, p18, p19) et Cip/Kip (p21, p27, p57). Ces CDKs peuvent elles-mêmes être régulées par d'autres protéines. Notamment, p14ARF, une protéine issue comme p16 du gène CDKN2A, inhibe l'action de MDM2, activant l'inhibition du cycle via p53 et p21.

La transition entre les différentes phases du cycle est complexe, hautement régulée par des mécanismes endogènes et exogènes. Trois points de contrôle principaux, ou « check point », se situent en fin de phase G1, en fin de phase G2 et au point de transition entre la métaphase et l'anaphase à la phase M. Les signaux endogènes permettant la mise en route du cycle sont essentiellement des signaux indiquant que la cellule se trouve dans un état d'équilibre permettant l'enclenchement de la prochaine phase (ADN intact et correctement répliqué, bonne taille et morphologie cellulaire, assemblage du fuseau mitotique, l'inhibition de contact etc...)²⁹⁶. Les points de contrôle bloquent l'avancée du cycle jusqu'à émission de signaux commandant sa reprise. Les régulateurs effectifs permettant l'avancement du cycle comprennent des activateurs, les kinases dépendantes des cyclines (CDK : *cyclin-dependant kinase*) associées aux cyclines sous forme de complexes CDK-cyclines ainsi que des inhibiteurs de CDK (CDKi : *cyclin-dependant kinase inhibitor*). Ces derniers dégradent les cyclines ou inhibent l'activation des complexes CDK-cyclines. Les fluctuations rythmiques de la quantité de cyclines spécifiques contrôlent la progression des phases²⁹³ (Figure 8).

b) Signaux mitogènes

Pour qu'une cellule quiescente (G0) entre en division, des signaux de départ sont nécessaires. Ces signaux, exogènes, proviennent principalement de communications avec d'autres cellules mais aussi directement du microenvironnement, permettant l'équilibre des tissus. Ils comprennent tout d'abord les facteurs mitogènes, de petites protéines incitant directement la cellule à commencer la division, comme les lectines. Les autres signaux exogènes de départ en cycle sont les facteurs de croissance. Ils sont capables non seulement de stimuler la prolifération de la cellule mais aussi sa différenciation²⁹⁷. En effet, certains facteurs de croissance, comme ceux de la famille du facteur de croissance épidermique (EGF : epidermal growth factor), sont capables d'induire directement la division cellulaire mais provoquent aussi des effets mitogènes indirects en modulant d'autres voies de signalisation.

L'EGF est retrouvé de façon physiologique à des concentrations significatives dans tous les fluides humains (1 à 500 ng/ml). Il agit en se liant à son récepteur, l'EGFR. Six autres ligands de l'EGFR ont été décrits à ce jour. Il s'agit du facteur de

croissance transformant- α (TGF- α : *transforming growth factor alpha*), de l'amphireguline (AREG), de l'épireguline (EREG), de la bétacelluline (BTC), du facteur de croissance analogue à l'EGF se liant à l'héparine (HB-EGF : *heparin-binding EGF-like growth factor*) et de l'épigène (EPI). La fixation d'un ligand sur l'EGFR entraîne l'activation d'un ensemble remarquable et complexe de voies de transduction, se traduisant par la modification des voies métaboliques, la mise en place de mécanismes de survie, de prolifération cellulaire et de réparation de l'ADN associés à l'activation de la signalisation anti-apoptotique et à l'augmentation de la motilité cellulaire. L'un des rôles clef de la signalisation de l'EGFR est l'induction de la production de la cycline D1, formant un complexe avec CDK4/6 initiant la progression du cycle cellulaire (Figure 9)²⁹⁸.

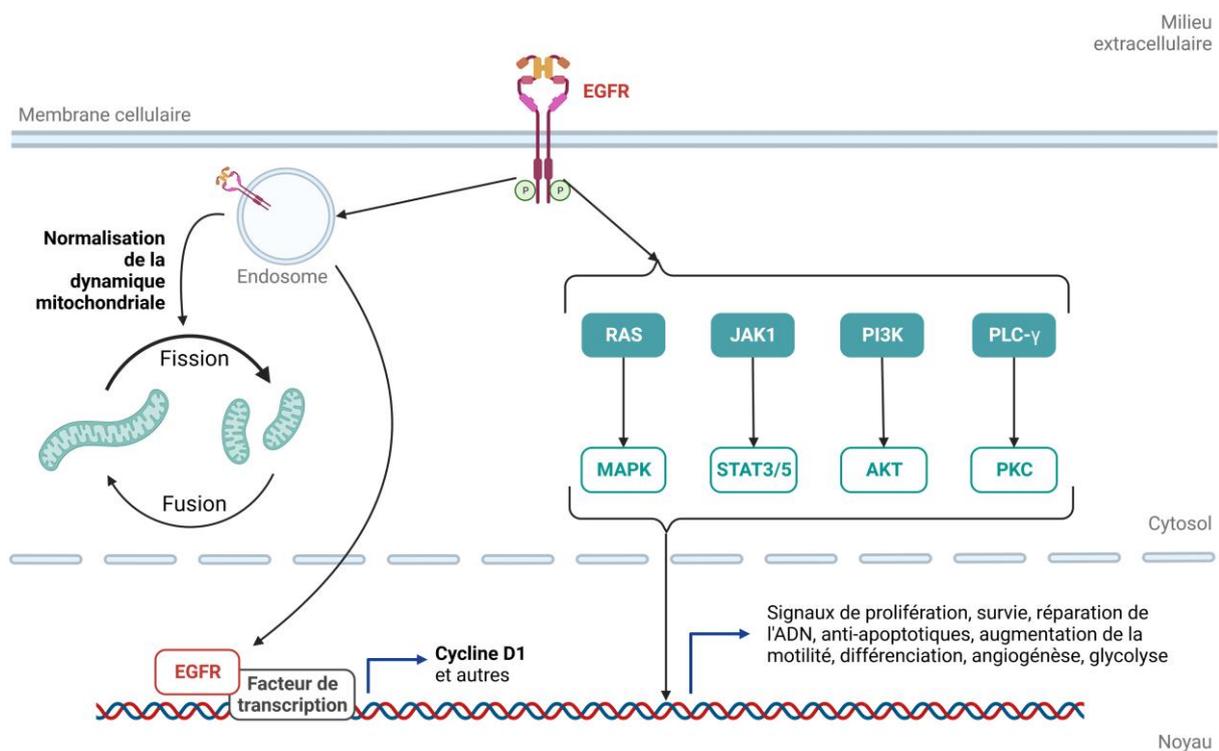


Figure 9 : signalisation EGFR. L'EGFR est activé par la liaison du ligand, provoquant l'homodimérisation ou l'hétérodimérisation du récepteur. La dimérisation induit une autophosphorylation et l'activation des voies de RAS/Raf-1/MAPK, JAK1/STAT3/5, PI3K/AKT, PLC- γ /PKC. Les récepteurs activés peuvent subir une endocytose suivie d'une translocation vers le noyau, où ils pourront avoir une activité co-transcriptionnelle de gènes clés comme la cycline D1, Cox-2, iNOS, aurora kinase-A, c-Myc, B-Myb, la thymidylate synthase et BRCP. Les récepteurs EGFR peuvent également subir une translocation mitochondriale à partir des endosomes, normalisant la dynamique mitochondriale en favorisant les phénomènes de fission. Toutes ces voies conduisent à de nombreux signaux permettant à la cellule de proliférer²⁹⁹⁻³⁰¹.

c) Métabolisme cellulaire et cycle

Le métabolisme est l'ensemble des réactions biochimiques au sein d'un organisme. Dans l'ensemble, le rôle des voies métaboliques consiste à gérer les ressources énergétiques et matérielles de la cellule. Les voies cataboliques libèrent de l'énergie par décomposition de molécules complexes en molécules plus simples tandis que les voies anaboliques consomment de l'énergie afin de réaliser la synthèse de molécules complexes à partir de molécules plus simples. L'énergie libérée lors des réactions cataboliques peut être stockée dans les liaisons phosphates riches en énergie de l'ATP, ou dans les électrons à haute énergie des molécules de nicotinamide adénine dinucléotide (NADH), de flavine adénine dinucléotide (FADH₂) ou de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), afin de servir à de futures réactions anaboliques²⁹³. En effet dans une cellule quiescente le glucose est utilisé pour la génération mitochondriale d'acétyl-CoA, qui est ensuite soumis à une oxydation dans le cycle de Krebs. Les électrons extraits des réactions d'oxydation du cycle de Krebs sont acheminés par les NAD⁺/NADH et FAD/FADH₂ vers la chaîne de transport des électrons, créant ainsi un gradient électrochimique qui alimente la production d'ATP.

Les besoins métaboliques d'une cellule qui entre en cycle sont profondément modifiés. En effet, la division cellulaire est un processus métaboliquement exigeant, qui nécessite la production de grandes quantités d'énergie et/ou de biomasse selon les phases. Ainsi, en phase G1 la cellule enclenche la production de milliers de protéines, typiques de la division cellulaire, mais également dans l'objectif de dupliquer la biomasse. On constate donc une baisse de la synthèse d'ATP se traduisant par une diminution de l'activité mitochondriale, associée à une forte augmentation de l'activité des voies anaboliques. La transition entre la phase G1 et S est caractérisée par une forte augmentation de la glycolyse et la glutaminolyse afin de fournir un regain d'énergie à la cellule. Cela se traduit par une augmentation de l'activité mitochondriale, notamment induite par la cycline D3, avec la mise en place d'une hyperfusion mitochondriale temporaire pour générer d'avantage d'ATP. La phase S se singularise par la réplication de l'ADN. Pendant de cette phase l'activation des voies ramifiées de la glycolyse et de la glutaminolyse fournissent les molécules nécessaires à la biosynthèse des nucléotides. Lors de la phase G2/M, le fort besoin en lipides afin de constituer la nouvelle membrane cellulaire est comblé par une augmentation de la

synthèse *de novo* favorisée notamment par E2F, la cycline D3 et E. Les besoins énergétiques de la cellule sont alors particulièrement soutenus par l'action de la G3P déshydrogénase (GAPDH), qui stimule la glycolyse. Pour finir, la phase M présente une forte baisse des activités de biosynthèse et l'apparition d'une hyperfission mitochondriale dans l'objectif de répartir les organites uniformément dans les deux cellules filles. Des activations transitoires et locales des mitochondries ont cependant lieu afin de fournir de l'ATP aux protéines motrices qui déplacent les chromosomes^{302,303}.

d) Particularités tumorales, impact sur la virothérapie

a. Gènes suppresseurs de tumeur et oncogènes

Dans les tumeurs, le cycle cellulaire est particulièrement bouleversé. En effet, la première caractéristique des cellules tumorales est la propension à la prolifération anarchique. La capacité à se diviser sans frein est déterminée par la dérégulation d'un ou plusieurs inhibiteurs ou activateurs du cycle cellulaire, appelés respectivement dans ce cadre gènes suppresseurs de tumeur et oncogènes.

Dans un premier temps, les gènes suppresseurs de tumeur ont pour fonction d'empêcher l'emballement de la division cellulaire, maintenant la cellule en phase G0 ou déclenchant son apoptose. Ces processus freinant le développement tumoral, ces gènes subissent souvent des mutations les rendant non fonctionnels lors du processus de tumorigénèse. Les protéines codées par ces gènes peuvent avoir un impact fonctionnel direct sur les capacités de réplication virale. De fait, de nombreux virus ont évolué vers des mécanismes d'atténuation de ces suppresseurs de tumeur dont l'activité antivirale est de plus en plus décrite. Elles sont d'ailleurs souvent désignées comme médiatrices des activités antivirales des IFN de type I³⁰⁴⁻³⁰⁶. Par exemple des protéines de virulence du virus d'Epstein-Barr (EBV : *Epstein-Barr virus*), du papillomavirus humain à haut risque (HPV : *human papillomavirus*) et du virus de l'hépatite C (HCV : *hepatitis C virus*) peuvent inactiver fonctionnellement le suppresseur de tumeur p53^{307,308}. En effet, cette protéine, dont le gène est retrouvé muté dans diverses tumeurs, est capable de diminuer la réplication de différents virus par activation directe de la signalisation IFN I. De ce fait, les mutations inactivatrices de ces gènes retrouvées dans les tumeurs en font des cibles privilégiées pour les OV,

dont les facteurs de virulence sont bien souvent rendus inopérants par les processus d'atténuation des souches utilisées pour la virothérapie.

D'un autre côté, les oncogènes codent pour des protéines stimulant la division cellulaire ou inhibant la mort cellulaire programmée. Ces gènes subissent couramment des mutations activatrices dans les tumeurs mais sont aussi décrits comme favorisant la réplication virale, notamment par l'activation des voies qu'ils favorisent. Par exemple, l'expression anormale de la protéine Rb phosphorylée (pRB) sensibilise les cellules tumorales à l'action lytique du cytomégalovirus (CMV) et des adénovirus^{309,310}. De même, l'activation constitutive des voies de signalisation Wnt, AKT et EGFR aide à la réplication de nombreux virus³¹¹⁻³¹⁴.

b. Métabolisme tumoral

Besoins métaboliques

Les cellules tumorales reprogramment leur voies métaboliques afin de soutenir la demande énergétique générée par leur croissance, mais également dans l'objectif d'atténuer les effets du stress environnemental qu'elle génère. Les modifications des voies métaboliques promouvant une division cellulaire intense peuvent impacter les infections virales de différentes façons. En effet, les virus exploitent les fonctions de la cellule hôte afin de produire et d'assembler les composants nécessaires à la production de nouvelles particules virales. Les besoins métaboliques et énergétiques nécessaires à leur réplication sont très similaires à ceux des cellules tumorales proliférantes¹⁸⁷.

Dans un premier temps, afin de soutenir ses besoins énergétiques, la cellule tumorale augmente son absorption de glucose, d'acides aminés et de glutamine par divers moyens plus ou moins opportunistes³¹⁵. Parmi ces moyens, la macropinocytose peut favoriser l'absorption de particules virales présentes dans le microenvironnement tumoral. Ce mécanisme d'entrée est d'ailleurs naturellement décrit pour de nombreux virus dont le virus de la vaccine, les adénovirus et le virus de la rougeole^{316,317}.

Dans un second temps, plusieurs voies métaboliques cellulaires essentielles, dont la glycolyse, la glutaminolyse et la synthèse des acides gras, sont activées en réponse à une infection virale, comme dans les cellules tumorales. Tout d'abord, les cellules tumorales convertissent préférentiellement l'excès de pyruvate généré par la

glycolyse en lactate. En effet, elles ont un besoin accru en molécules précurseurs et en équivalents réducteurs mais consomment relativement peu d'ATP par rapport à leur activité. Le cycle de Krebs génère du NADH mais aussi de l'ATP qui est le principal régulateur négatif de la glycolyse qui, elle, fournit une grande quantité d'équivalents réducteurs. La conversion du pyruvate en lactate réduit la production d'ATP par les mitochondries, sans répression de la glycolyse qui fournit le NADH nécessaire à l'activité cellulaire³¹⁵. Ce processus, appelé effet Warburg, correspond à un état métabolique favorable aux demandes biosynthétiques accrues et a pu être mis en évidence notamment lors d'infection virales^{318,319}. Par exemple, la réplication de certains virus, comme le HSV-1 ou les rhinovirus, est dépendante du métabolisme du glucose. Leur infection provoque une augmentation de l'absorption de glucose médiée notamment par l'augmentation de l'expression du transporteur de glucose (GLUT) de classe I (GLUT1), associée à un efflux important de lactate. La privation de glucose dans le milieu induit une baisse de la production de virions³²⁰. Par ailleurs, il a été démontré que certaines enzymes de la glycolyse sont directement impliquées dans les étapes de réplication des paramyxovirus³²¹.

Ensuite, l'absorption importante de glutamine et son métabolisme accru dans les cellules tumorales permet la synthèse *de novo* de grandes quantités de molécules contenant de l'azote, notamment des nucléotides et des acides aminés non essentiels. Il a été montré que la présence de certains acides aminés, l'arginine, l'isoleucine et la réonine, est essentielle à la bonne réplication virale, notamment du virus de la rougeole³²². Leur forte concentration dans les cellules tumorales est donc particulièrement favorable à la réplication des OV, tout comme l'abondance d'acides nucléiques pour la synthèse des nouveaux génomes viraux. Dans le cadre du MPM, une activité transcriptionnelle plus élevée a été remarquée dans les sous-types histologiques épithélioïdes comparés aux sous-types sarcomatoïdes, les rendant peut être plus sensibles aux OV³²³. Par ailleurs, certains OV sont dépendants des enzymes de production de ces acides nucléiques, dont l'expression est couramment augmentée dans les cellules tumorales. Ainsi, la délétion de la thymidine kinase (TK) du virus JX594 lui confère une dépendance à l'activité de la TK de la cellule hôte. Cette enzyme, présente et active uniquement dans les cellules en division, catalyse la réaction permettant la synthèse d'un des monomères constituant de l'ADN, la thymidine monophosphate (TMP)³²⁴. De même, le virus oncolytique de l'herpès

G47delta a trois de ses gènes mutés dont *ICP6*, une ribonucléotide réductase (RR) indispensable à la synthèse d'ADN et à la réplication virale³²⁵.

L'entreprise française Transgène teste en essai clinique de phase I/II contre les cancers gastriques, le virus de la vaccine TG6002 qui est à la fois TK- et RR- et qui contient un gène suicide *FCU1* capable de transformer le 5-fluorocytosine en 5-fluorouracile, limitant ainsi la toxicité du 5FU à la tumeur (NCT03724071 ; NCT04194034). La version de ce virus non armée du gène *FCU1* et codant la GFP (VV *TK-RR-GFP+*) a fait l'objet d'une étude à laquelle j'ai participé et qui montre une activité oncolytique importante contre le MPM³²⁶. En effet, les 22 lignées de MPM étaient permissives à la réplication du virus à des niveaux variables. Dans un modèle de xénogreffe intra-péritonéale (IP) d'une lignée humaine de MPM en souris NOD/SCID, nous avons montré une prolongation de survie de plusieurs semaines des souris injectées en IP avec le VV *TK-RR-GFP+* par rapport aux souris contrôles traitées par le PBS.

Enfin, une conséquence commune de l'infection par de nombreux virus et de la tumorigénèse est la modification de la nature du métabolisme des lipides. En effet, les cellules tumorales, comme les cellules infectées, favorisent une forte synthèse des acides gras. Cette synthèse permet de soutenir la production de la nouvelle membrane lors de la division cellulaire, soutenant par ailleurs la libération des particules virales enveloppées³²⁷. Ainsi, l'inhibition de la synthèse des acides gras bloque la réplication du SRAS-CoV-2. De même, le virus de la rougeole induit une augmentation de la synthèse de certains acides gras afin de favoriser le bourgeonnement des particules virales³²⁸.

Stress métabolique

Malgré les adaptations métaboliques formidables des cellules tumorales, la masse cellulaire en prolifération exponentielle se retrouve inévitablement dans un état de déséquilibre physiologique. De fait, les cellules en prolifération accumulent souvent un flux de transport d'électrons qui dépasse la capacité de l'ATP synthase, entraînant la formation d'un excès d'espèces réactives de l'oxygène (ROS : *reactive oxygen species*)³¹⁵. Par ailleurs, la vascularisation aberrante des tumeurs occasionne un faible approvisionnement en oxygène et nutriments des tissus distants des vaisseaux fonctionnels. Le stress métabolique que cela engendre augmente la production de

métabolites tels que l'acide lactique et l'acide carbonique, modifiant fortement pH extracellulaire et occasionnant aussi un stress oxydatif important³²⁹. Ces remaniements homéostatiques peuvent avoir un certain impact sur la capacité des OV à infecter les tissus tumoraux et à s'y répliquer. Par exemple, une faible tension d'oxygène exerce des effets significatifs mais aléatoires sur la réplication de plusieurs virus à ADN et à ARN dans des cellules en culture et *in vivo*³³⁰. En ce qui concerne les paramyxovirus, ils semblent plutôt bénéficier du manque d'oxygène. Notamment, l'infection par un NDV oncolytique, provoque une réaction IFN 1 moins importante dans les cellules sous condition d'hypoxie, par un mécanisme indépendant du facteur induit par l'hypoxie (HIF-1 : *Hypoxia-inducible factor-1*)³³¹.

Mitochondries

Même si l'effet Warburg décrit dans les cellules tumorales défavorise la production mitochondriale d'ATP, il a été montré que les mitochondries restent bien souvent fonctionnelles et conservent, entre-autres, la capacité de réaliser la phosphorylation oxydative. En effet, il est aujourd'hui admis que les défauts de la respiration mitochondriale ne sont généralement pas sélectionnés au cours de l'évolution tumorale et qu'ils ne sont donc pas responsables de la mise en place d'une glycolyse aérobie préférentielle³³².

En revanche, la dérégulation de la dynamique mitochondriale a été liée à l'initiation et à la progression de divers cancers humains. Celle-ci est régulée par la loi de l'offre (apports en nutriments) et de la demande (besoins énergétiques), grâce à des phénomènes de fusion et de fission régulés par des GTPases de la famille des dynamines. La fusion du pool mitochondrial, régulée par la mitofusine (MFN) et la protéine de l'atrophie optique 1 (OPA1 : *optic atrophy 1*), est associée à une production accrue d'ATP³³³. Par ailleurs, la fission des mitochondries, régulée par la protéine liée à la dynamine (DRP1 : *dynamine-related protein*), entraîne une altération de la phosphorylation oxydative³³³. Malgré l'accumulation de données sur les acteurs et la mécanistique de la dynamique mitochondriale, nous ne savons que très peu de choses sur les mécanismes intra et extracellulaire régulant ce processus. Dans la plupart des cancers, la fission mitochondriale facilite le développement tumoral. Cependant on a constaté que c'était parfois plutôt les phénomènes de fusion qui favorisaient la tumorigénèse³³⁴. Dans une étude transcriptomique récente, Grosso *et al* ont pu

montrer que le MPM présente une augmentation significative de l'expression de protéines pro-fission avec une phosphorylation accrue de la protéine DRP1 cohérente avec la fragmentation du réseau mitochondrial observée en microscopie³³⁵.

Une association étroite existe entre la dynamique mitochondriale et les réponses immunitaires antivirales. Notamment, il a été montré que les cellules dont la dynamique mitochondriale tend vers la fusion présentent une activation accrue des promoteurs IFN- β et NF- κ B lors d'infection. A l'inverse, dans les cellules dont les mitochondries sont fragmentées la réponse antivirale est atténuée. De fait, il semblerait que l'élongation du réseau mitochondrial favorise l'interaction entre MAVS et STING³³⁶. Il a aussi été montré que l'ADN mitochondrial (ADNmt) cytosolique libéré par les mitochondries hyperfusionnées au cours de l'infection par le virus de la rougeole est capturé par le cGAS et entraîne l'activation de la voie de détection de l'ADN en plus de la détection canonique de l'ARN³³⁷. L'état fragmenté des mitochondries dans le MPM pourrait donc faciliter la réplication des OV, notamment du MV. Par ailleurs, les mitochondries peuvent être directement ciblées au cours des infections par les protéines virales. Par exemple, le virus sauvage de la rougeole active la mitophagie médiée par p62, perturbant MAVS et entraînant une inhibition significative des réponses IFN I³³⁸. Ces processus de mitophagie sont couramment décrits dans différents cancers et pourraient donc favoriser la thérapie par OV³³⁹.

c. Dormance tumorale et virus

Lorsque les conditions de stress environnementaux ou thérapeutiques deviennent trop intenses, les cellules tumorales ont la capacité de modifier leur état métabolique pour se mettre en dormance. Les cellules cancéreuses dormantes prolifèrent moins vite voir pas du tout, présentant des propriétés de cellules souches et/ou de sénescence³⁴⁰. Ce mécanisme d'échappement tumoral, initialement étudié dans le cadre de récives tardives sur des sites métastatiques, est aussi associé à des phénomènes de résistance aux traitements anticancéreux dans les tumeurs primaires. En effet, la présence de cellules en dormance a été attestée dans de nombreux cancers, notamment au contact de zones denses et riches en fibronectine, hypoxiques et inflammatoires (IL-6, TNF- α)²⁹². En particulier, différentes études ont pu montrer que l'hypoxie au sein de sphéroïdes de MPM est responsable de la mise en dormance des cellules tumorales et associée à une résistance à la chimiothérapie^{341,342}.

La dormance des cellules tumorales implique un état métabolique et des voies de signalisation qui sont également particulièrement défavorables à la réplication virale²⁹². Dans un premier temps, une cellule en dormance présente une cinétique de cycle cellulaire très ralentie associée à une diminution du métabolisme³⁴³. Comme nous l'avons décrit précédemment, la plupart des virus et des OV, étant des parasites obligatoires, ont une grande dépendance vis-à-vis des voies métaboliques de la cellule. Par exemple, il a été montré que la mise en dormance des cellules de cancer ovarien cultivées sous forme de sphéroïdes induit une baisse d'expression du récepteur au LDL (LDLr : *low density lipoprotein receptor*). Cette baisse d'expression impacte négativement la réplication du VSV et du virus de Maraba oncolytiques, dont le LDLr est le récepteur d'entrée principal³⁴⁴. Par ailleurs, l'arrêt du cycle cellulaire fait partie des mécanismes de la réponse IFN I permettant de réguler la réplication virale, notamment via l'activation de CDKi comme p21³⁴⁵.

Mais la mise en dormance implique également d'autres processus impactant la réplication virale. Notamment, l'autophagie contribue à la survie des cellules tumorales en dormance en recyclant les organelles et les protéines endommagées. En effet, ce mécanisme catabolique palie au manque de nutriments en générant une voie alternative de production d'ATP et favorise la réparation des dommages à l'ADN dues au stress oxydatif par le renouvellement des amines³⁴⁶. Néanmoins, il est également très fortement impliqué dans le cycle répliatif de nombreux virus. De fait, les processus d'autophagie sont considérés comme des mécanismes de défense innés contre les infections virales. L'autophagie peut notamment être induite par la stimulation des PPRs et permet la dégradation sélective des virions dans les autophagolysosomes, aussi appelée xénophagie virale^{347,348}. Des études récentes ont montré que l'inhibition de l'autophagie peut améliorer l'efficacité de certains virus oncolytiques³⁴⁹.

Néanmoins, d'autres virus ont développé des stratégies d'exploitation de ce processus. Par exemple, HSV-1 induit l'autophagie au début de l'infection afin de bénéficier d'un transport vésiculaire et d'échapper aux défenses immunitaires de l'hôte³⁵⁰. De même, le virus de la rougeole semble bénéficier de la mise en place de l'autophagie malgré la dégradation d'une partie des composants viraux. Dans un premier temps, l'engagement du CD46 par les souches atténuées du MV est suffisant pour induire la mise en place d'une autophagie dans la cellule infectée³⁵¹. Le

mécanisme est ensuite maintenu dans le temps par la réplication virale, grâce à l'interaction des protéines M et C avec les facteurs déclenchant l'autophagie et via la formation des syncytiums³⁵². Dans le cas du MPM, plusieurs études ont montré que l'autophagie est souvent activée dans les cellules tumorales en réponse au stress métabolique, leur conférant par ailleurs une résistance aux traitements anticancéreux³⁵³. Par conséquent, l'utilisation d'OVs sachant tirer parti de ce processus pourrait être une stratégie efficace contre le MPM.

B. Le micro environnement tumoral et les virus

Une multitude de processus peut influencer l'infection et la réplication des virus. De fait, ils co-évoluent avec leurs hôtes depuis des siècles, si bien que l'intrication des mécanismes impliqués dans les phénomènes d'infection dépasse probablement les capacités d'intégration du cerveau humain. La majorité des facteurs de restriction ou de sensibilité des OVs présentés jusqu'à présent dans la littérature scientifique se concentrent sur les mécanismes de résistance ou de vulnérabilité médiés par les cellules tumorales, dont nous avons donné un aperçu non exhaustif³⁵⁴. Néanmoins, une tumeur ne consiste pas seulement en un assemblage de cellules cancéreuses hétérogènes. On y retrouve en réalité une grande variété de cellules saines infiltrantes et résidentes ainsi que de nombreux facteurs solubles, contenus dans une matrice extracellulaire (ECM : *extracellular matrix*) riche et complexe, influençant profondément l'expansion de la tumeur et son échappement. Cet ensemble constitue le tissu conjonctivo-vasculaire que l'on appelle le « microenvironnement tumoral »¹⁸⁹.

L'administration d'un OV, qu'elle soit intratumorale ou systémique, doit donc surmonter un environnement tumoral local qui limite la biodistribution du virus. En effet, la physiologie d'une tumeur représente une véritable barrière à la propagation homogène d'éléments thérapeutiques³²⁹. La vascularisation hétérogène, la matrice extracellulaire dense et la compacité cellulaire des tumeurs solides entraînant des contraintes physiques et homéostatiques extrêmes, sont présentées comme les principaux obstacles à la délivrance des traitements et des OVs aux cellules tumorales³⁵⁵. À ceci vient s'ajouter la présence de nombreux facteurs solubles : en effet, si la barrière physique de l'ECM est le cercueil des OV, les protéines antivirales extracellulaires en sont les clous. Et enfin, les cellules stromales immunitaires ou non, bien qu'ayant souvent des fonctions altérées au profit de la tumeur, possèdent tout de même des

défenses antivirales parfois efficaces, susceptibles de fortement inhiber l'action des OV.

1. Vascularisation / Perméabilité vasculaire des tumeurs

Tout d'abord, la voie d'administration d'un traitement est un sujet d'intérêt thérapeutique majeur depuis de nombreuses années. L'objectif principal est de maximiser les effets sur le tissu cible tout en limitant les effets secondaires. Dans le cadre du cancer, cela revient à dire qu'il faut concentrer la dose administrée aux tissus malins tout en réduisant celle des tissus sains. Il est cependant difficile de prévoir la dose exacte de virus que va recevoir la tumeur. Celle-ci va largement dépendre des obstacles présents sur la route du virus. Les différentes voies d'administration possibles et leurs contraintes sont résumées dans la **Figure 10**.

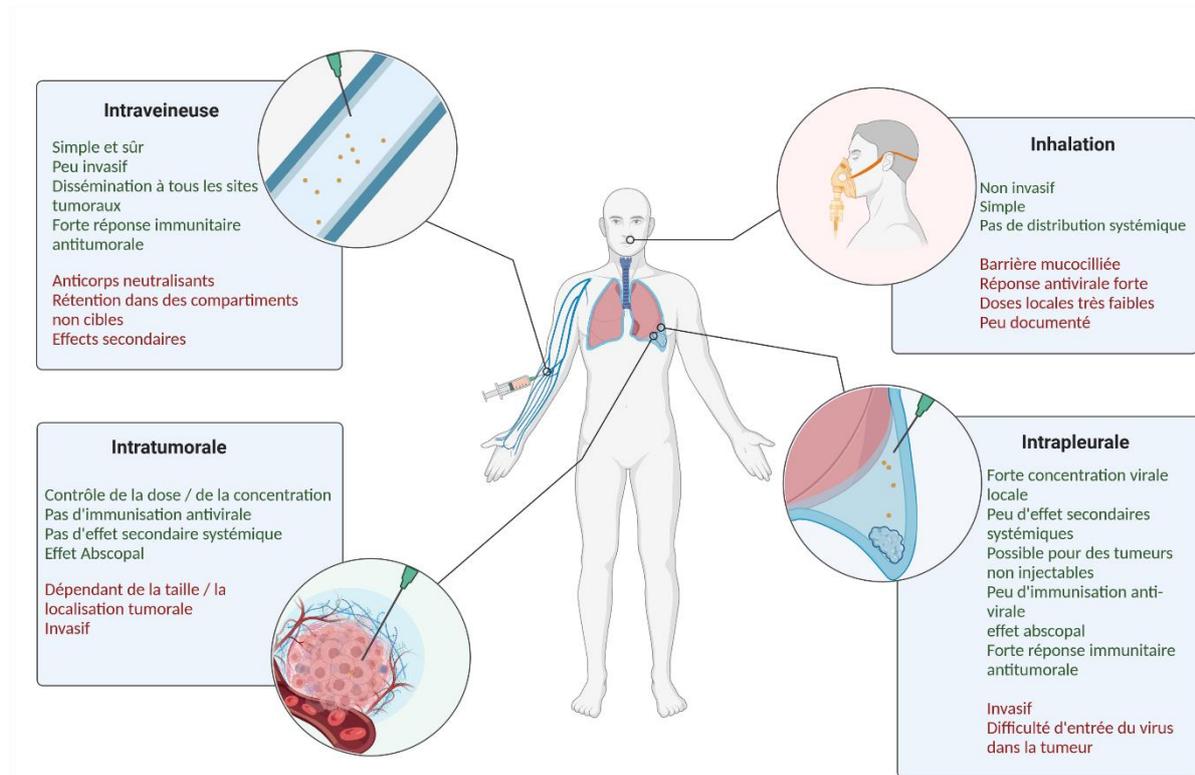


Figure 10 : enjeux des voies d'administration des virus oncolytiques aux cancers thoraciques. Plusieurs voies d'administration ont été envisagées et testées à travers différentes études concernant les cancers thoraciques, qu'elles soient locales, régionales ou systémiques, avec différents avantages (en vert) et inconvénients (en rouge)^{167,356,357,357,358}.

Ensuite, dans toutes les voies d'administration, les OV vont arriver et circuler dans la tumeur par le réseau capillaire qui l'irrigue. Le potentiel de prolifération des cellules tumorales étant bien plus important que celui des cellules formant les capillaires sanguins, on constate dans les tumeurs une forte réduction de la densité vasculaire en comparaison à un tissu sain. Celle-ci est associée à une néo-architecture des vaisseaux totalement désordonnée, due à une balance aberrante de facteurs pro et anti-angiogéniques, sous compression de la masse tumorale en croissance³⁵⁹. Ce réseau vasculaire anarchique et incomplet crée des isolats de cellules mal irriguées, dans lesquels des molécules thérapeutiques ou des particules virales trouvent difficilement leur chemin³²⁹. En effet les vecteurs viraux oncolytiques sont de grosses particules dont la diffusion est fortement impactée par l'extravasation inefficace des vaisseaux sanguins tumoraux et la pression élevée du liquide interstitiel dans la masse tumorale. De même, les gradients de concentration de ce liquide sont un véritable obstacle à la diffusion passive des OV vers les tissus tumoraux vivants³⁶⁰.

Le MPM semble être l'un des cancers ayant la densité de micro-vaisseaux la plus importante, ce qui a d'ailleurs été rapporté comme étant de mauvais pronostic dans plusieurs études^{361,362}. Cette caractéristique pourrait faciliter la diffusion d'un OV au sein de la tumeur. Cependant, le rôle de l'axe VEGF/VEGFR dans le MPM est bien connu et est fortement associé à une haute perméabilité vasculaire, provoquant d'ailleurs les épanchements pleuraux régulièrement retrouvés chez les patients souffrant de cette pathologie³⁶³. Ces défauts de perméabilité vasculaire et la pression interstitielle engendrée sont associés à une mauvaise diffusion des molécules thérapeutiques, notamment des OV. En effet, une pression vasculaire physiologique semble être un élément crucial permettant l'extravasation virale³⁶⁴. Ainsi, l'association d'un Sindbis virus oncolytique et d'agents améliorant la qualité de la perméabilité vasculaire tumorale permet un ciblage beaucoup plus efficace du vecteur dans un modèle murin³⁶⁵.

2. Les anticorps neutralisants

Une grande majorité des patients possèdent une pré-immunisation contre certains virus oncolytiques. Cette pré-immunisation peut être due à une vaccination, comme c'est par exemple le cas pour le virus de la vaccine³⁶⁶ ou celui de la rougeole³⁶⁷, ou encore à un contact préalable avec la souche sauvage du virus,

comme pour les herpesvirus ou les réovirus³⁶⁸. La présence d'anticorps neutralisants préexistants est particulièrement problématique pour la délivrance systémique. Mais l'effet de cette séropositivité sur l'efficacité thérapeutique d'un virus oncolytique administré par voie intraveineuse (IV) dépend largement de la capacité des virus à se cacher du système immunitaire de l'hôte. Par exemple, la pré-immunisation semble limiter la toxicité mais aussi l'activité antitumorale de CN706, un adénovirus oncolytique, dans un modèle de xénogreffe de tumeur de la prostate chez des souris immunodéficientes³⁶⁹. Des résultats similaires ont été trouvés pour le virus de la rougeole : la présence d'anticorps suite à la vaccination présente une limite majeure à l'utilisation de ce virus par voie IV¹⁷⁹. Ceci est appuyé par l'efficacité supérieure du virus chez des patients immunodéprimés et présentant un faible niveau d'anticorps anti-rougeole³⁷⁰.

De plus, de nombreux designs thérapeutiques utilisent aujourd'hui de multiples injections à plusieurs jours d'intervalle¹⁶⁶. De ce fait, même en l'absence d'une pré-immunisation, l'augmentation du taux sérique d'anticorps circulants contre un virus après le traitement peut également être un frein à l'efficacité clinique et a été rapportée dans le nombreux cas. Par exemple, l'administration répétée en IV de réovirus chez des souris immunocompétentes portant des allogreffes de tumeurs a démontré une repousse tumorale en quelques semaines qui a coïncidé avec l'augmentation des titres d'anticorps neutralisants dirigés contre le virus³⁷¹. Une étude clinique de phase I évaluant les réponses immunitaires des patients suite à l'injection en IV de ce même virus a pu montrer que les titres d'anticorps sériques sont très fortement augmentés même chez les patients pré-immunisés³⁷². Le pic de concentration des immunoglobulines sériques se situant entre 7 et 14 jours, il est donc recommandé pour ce type de thérapie d'effectuer une série d'injections de hautes doses et rapprochées dans le temps³⁷³. Dans une étude clinique de phase 1 comparant l'administration en IV et en intratumoral (IT) de l'enadenotucirev, un adénovirus oncolytique, le titre sérique des immunoglobulines G des patients injectés en IT était très bas, comparé au titre très élevé retrouvé chez les patients injectés en IV³⁷⁴. Cependant aucune différence de bénéfice clinique entre les deux modes d'injection n'a été trouvée. Enfin, une étude clinique de phase I évaluant les réponses immunitaires des patients suite à l'injection en IV d'un reovirus a pu montrer que les titres d'anticorps sériques sont très fortement augmentés même chez les patients qui pré-immunisés³⁷². Il semblerait donc

que la mise en place d'une immunité antivirale à base d'anticorps neutralisants circulants limite l'efficacité thérapeutique des OV, surtout lors d'une injection systémique. Cette limite est dépendante de la nature du virus utilisé et de sa capacité à se dissimuler au système immunitaire de l'hôte.

Face à cette problématique, l'utilisation de virus ayant évolué pour se dissimuler naturellement face au système immunitaire de l'hôte peut être envisagée. Par exemple, le virus de la vaccine présente une résistance aux anticorps neutralisants circulants et au complément grâce à sa dissémination en partie sous une forme de particules virales enveloppées³⁷⁵. Une étude de phase I évaluant la sûreté du JX-594, un virus de la vaccine oncolytique, injecté en IV, a démontré une absence de corrélation entre le titre d'anticorps avant traitement et la réplication virale³⁷⁶. Une autre étude de phase II concernant ce même virus a pu montrer que malgré la pré-séropositivité de la moitié des patients, aucune différence de bénéfice clinique n'a pu être établie⁸⁹. Il est également possible d'améliorer encore la furtivité du VV en augmentant la part de particules virales enveloppées produite qui ne représente naturellement que 1% des virions³⁷⁷.

Ensuite, le prétraitement avec un immunosuppresseur est une des stratégies couramment retrouvées afin d'augmenter la distribution sur le site tumoral d'un virus oncolytique injecté en IV. Le cyclophosphamide (CPA) est un médicament chimiothérapeutique utilisé avec succès depuis plusieurs dizaines d'années, provoquant également une immunosuppression³⁷⁸. Cependant, il a été montré chez l'humain et dans plusieurs modèles animaux qu'une dose unique de CPA ne suffit pas à prévenir le blocage du MV et du VSV par des anticorps neutralisants. Seules de multiples doses, tuant les lymphocytes en prolifération, paraissent supprimer cette réponse chez la souris³⁷⁹. Malgré tout il semble important de se demander s'il est judicieux de provoquer une immunosuppression puisqu'une grande partie de l'efficacité thérapeutique des OV est due à une activation du système immunitaire contre la tumeur.

D'autres stratégies visant à diminuer l'immunogénicité des OV ont été envisagées. En ce qui concerne les adénovirus, de nombreuses études ont montré qu'en modifiant l'expression protéique du virus ou le sérotype de la capside il était possible de réduire fortement la génération d'anticorps bloquants circulants^{380,381}. Ainsi, ColoAd1, un adénovirus AD11/Ad3, semble beaucoup moins immunogène que

le sérotype Ad5104 en plus de posséder un plus fort potentiel oncolytique³⁸². D'autres stratégies visant à baisser l'immunogénicité des virus oncolytiques ont été testées. Par exemple, la protéine G de fusion du VSV étant hautement antigénique, elle a été remplacée par une variante de la glycoprotéine du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV-GP) sans immunité pré-existante dans la population³⁸³. L'injection du virus modifié, en plus de prolonger la survie dans des modèles de xénogreffe de mélanome chez la souris, ne provoque pas d'immunisation via des anticorps neutralisants même après 42 semaines.

De très nombreuses autres stratégies ont montré leur efficacité afin d'éviter une réaction antigénique au virus injecté en IV³⁸⁴ : Le masquage antigénique³⁸⁵, le coating³⁸⁶, l'encapsulation³⁸⁷, l'utilisation de *cell carriers*³⁸⁸, Etc... Cependant dans certains cas l'injection en IV semble augmenter la réponse immunitaire antitumorale en comparaison à une injection IT malgré la présence de ces anticorps neutralisants, en plus de fournir un bénéfice bien plus important pour les patients souffrants de métastases³⁸⁹.

3. Matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est un réseau dense et complexe, composé de plus de 300 molécules différentes, notamment des protéines, glycoprotéines et polysaccharides comprenant différents types de collagènes, des laminines, des fibronectines, des protéoglycans et de l'acide hyaluronique³⁹⁰. Chaque type histologique présente un "matrisome" spécifique à la fonction du tissu, présentant ces différentes protéines sous des proportions et une organisation variables³⁹¹. Mais au sein d'une tumeur, la composition et l'architecture de ce matrisome sont profondément affectées. En remodelage constant, elles sont étroitement associées à l'expansion et l'invasion tumorales. Ces nouvelles structures, changeantes, sont présentées comme une importante barrière physique aux OV, en plus de posséder des fonctions antivirales directes par le biais de facteurs solubles ou de mécanismes de transduction transversaux³⁹².

a) Barrières physiques

De nombreuses études précliniques ont démontré que ces bouleversements structuraux des matrices extracellulaires tumorales représentent de véritables

barrières physiques à la diffusion des OV. Le tissu tumoral extrêmement dense et bordé d'un mur de protéines fibrillaires épais est un réel frein à la mobilité virale³²⁹. Ainsi, après une injection intratumorale dans un modèle murin, la propagation d'un virus de la forêt de Semliki oncolytique était bloquée à cause de son diamètre trop important (60nm), par la barrière physique que formait l'ECM³⁹³. De même, la capacité de diffusion d'un adénovirus oncolytique dans un carcinome hépatocellulaire après injection intraveineuse ou intraportale était directement liée à l'épaisseur de la capsule d'ECM enveloppant les nodules tumoraux dans un modèle de rats immunocompétents³⁹⁴. En effet, la matrice extracellulaire tumorale ne présente absolument pas une structure homogène. Son architecture dense compartimente des espaces cellulaires de différentes compositions comprenant aussi des territoires nécrotiques ne permettant pas la diffusion virale. De plus, cette ECM se projette parfois en de grandes zones matricielles sans cellules, formant des septums compacts inhibant totalement la propagation virale à d'autres secteurs cellulaires³⁹⁵. Des amas de collagènes et d'héparane sulfate dans la ECM d'explants tumoraux de mélanome et de cancer du poumon ont notamment été montrés comme limitant l'expansion d'un NDV oncolytique³⁹⁶.

Ainsi, la compartimentation parfois très importante observée dans les tissus tumoraux, associée aux zones denses de matrice et aux zones nécrotiques prévient malheureusement efficacement l'expansion des OV, qui nécessitent bien souvent une proximité cellulaire immédiate afin de se propager. En effet, même si certains virus, comme les paramyxovirus, les Poxvirus ou les Herpesvirus sont capables de se passer presque entièrement d'une étape extracellulaire pour se propager, ils nécessitent tout de même l'existence de contacts intimes entre cellules, comme le montrent notamment de nombreux modèles mathématiques^{397,398}. Or le tissu tumoral n'étant pas continu, la capacité d'infection des OV sera fatalement limitée, donnant un intérêt accru aux stratégies de multiples injections intratumorales.

b) Facteurs solubles et antiviraux de l'ECM

L'ECM, en plus de représenter une véritable barrière physique à la diffusion des OV, contient de nombreux facteurs solubles et composés à activité antivirale directe. En effet, l'ECM n'est pas qu'un milieu complexe dans lequel baignent les cellules stromales : Les différents éléments de la matrice sont étroitement liés aux cellules,

notamment via les récepteurs d'adhésion, formant un véritable réseau dynamique et interconnecté³⁹⁹. Au sein de ce réseau la transduction de nombreux signaux permet de réguler diverses fonctions cellulaires, telles que la survie, la croissance, la migration et la différenciation, ainsi que les défenses antivirales. Ainsi, la protéine matricielle *Cysteine rich 61* (CCN1) semble par exemple capable d'activer la cascade de signalisation des IFN I de cellules de gliome en se liant à un récepteur à intégrines. Cette activation a pour conséquence une baisse significative de la réplication virale et donc une efficacité oncolytique limitée⁴⁰⁰. Face à cela, des stratégies à base d'anticorps bloquant les récepteurs à intégrines ont montré des résultats prometteurs, notamment vis à vis de la capacité oncolytique d'un HSV-1 dans des modèles de xénogreffes orthotopiques de cancer du sein triple négatif et de glioblastome⁴⁰¹.

L'ECM est également associée et sert de réservoir à un grand nombre de protéines sécrétées non structurales, telles que des facteurs de croissance, des enzymes mais aussi des protéines à action antivirale. En effet, un grand nombre de peptides antimicrobiens (AMP : *antimicrobial peptides*) extracellulaires jouent aussi un rôle inhibiteur pour de nombreux virus via différents mécanismes⁴⁰². Les principaux composants antiviraux présents dans les voies respiratoires comprennent les défensines, les cathélicidines, la lactoferrine, l'inhibiteur sécrétoire de la protéase leucocytaire (SLPI : *secretory leukocyte protease inhibitor*) et les lysozymes⁴⁰³. Les défensines sont souvent retrouvées exprimées dans les tumeurs thoraciques⁴⁰⁴. Leur présence dans l'ECM implique une résistance significative à l'infection par les virus⁴⁰⁵. Ainsi, la défensine alpha HD5 produite par les cellules épithéliales de cancer ovarien et pulmonaire *in situ* inhibe la propagation d'un adénovirus oncolytique⁴⁰⁶. Néanmoins, dans le MPM, les défensines et les autres AMPs sont souvent retrouvées mutées et non fonctionnelles⁴⁰⁷, offrant un terrain potentiellement favorable à l'expansion tumorale mais également à une infection par un OV. De plus, leur rôle dans les thérapies par OV n'est pas tout à fait clair. En effet, leur présence paraît induire la chimio-attraction et la prolifération des lymphocytes T activés et des cellules dendritiques immatures, potentialisant les réponses immunitaires antitumorales⁴⁰⁸. Les propriétés immunostimulantes des défensines pourraient donc être exploitées pour augmenter l'efficacité thérapeutique des OVs.

C. Populations cellulaires résidentes

1. Généralités

Un ensemble complexe de cellules non malignes évolue au sein de la tumeur. En effet, durant le processus de tumorigénèse, les cellules dysplasiques modèlent leur environnement à travers différents mécanismes de façon à promouvoir leur prolifération. Parmi les mécanismes utilisés, elles attirent, recrutent et subvertissent des populations cellulaires locales ou distales. Ces cellules, devenant des cellules de soutien de la niche tumorale, interagissent entre-elles et avec les cellules cancéreuses, favorisant leur croissance, l'échappement immunitaire et le développement de métastases⁴⁰⁹. Les cellules non malignes présentes dans le microenvironnement tumoral peuvent représenter jusqu'à 90 % du volume d'une tumeur. De nombreux types cellulaires, immunitaires ou non, sont présents dans le stroma et leurs proportions varient selon le type de tumeur et tout au long de l'évolution de la maladie (**Figure 11**). Par ailleurs, de grandes disparités de composition du stroma peuvent-être retrouvées entre les patients, influençant l'efficacité des traitements anti-cancéreux et notamment des immunothérapies⁴¹⁰.

Le profil de l'infiltrat immunitaire du MPM est décrit comme très hétérogène. Néanmoins la plupart des études font état de la prédominance de macrophages associés aux tumeurs (TAM : *tumor-associated macrophages*)²⁸⁹. La présence de ces cellules immunosuppressives en grand nombre, dans le stroma tumoral mais également dans l'épanchement pleural, est significativement associée à un mauvais pronostic, corrélant avec un taux de prolifération accru et une moindre réponse à la chimiothérapie⁴¹¹. Il a été montré que la population de macrophages immunosuppressifs du MPM proviendrait essentiellement de la différenciation de monocytes, attirés dans la tumeur par le contenu inflammatoire de l'épanchement pleural⁴¹². Ces macrophages jouent notamment un rôle clef dans la prolifération tumorale, amplifiant l'inflammation locale et facilitant la transition épithélio-mésenchymateuse à l'origine de métastases. Néanmoins, les macrophages résidant dans les tissus et d'origine embryonnaire acquièrent également un phénotype immunosuppressif, contribuant entre-autres à l'épuisement de la population lymphocytaire par activation constante de la réponse IFN- γ ⁴¹³.

La plupart des études mettent également en avant la présence de lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL : *tumor-infiltrating lymphocytes*), en particulier les LT CD4+ et CD8+, qui sont également présents dans l'épanchement pleural. Leur présence en quantité modérée est considérée comme un facteur de bon pronostic, suggérant notamment que leurs fonctions cytotoxiques peuvent encore être effectives. Cependant, des niveaux élevés de TILs CD8+ sont associés à une forte expression de PD-L1 et une faible réponse à la chimiothérapie⁴¹⁴. Enfin, on observe dans une moindre mesure des cellules NK et des Treg.

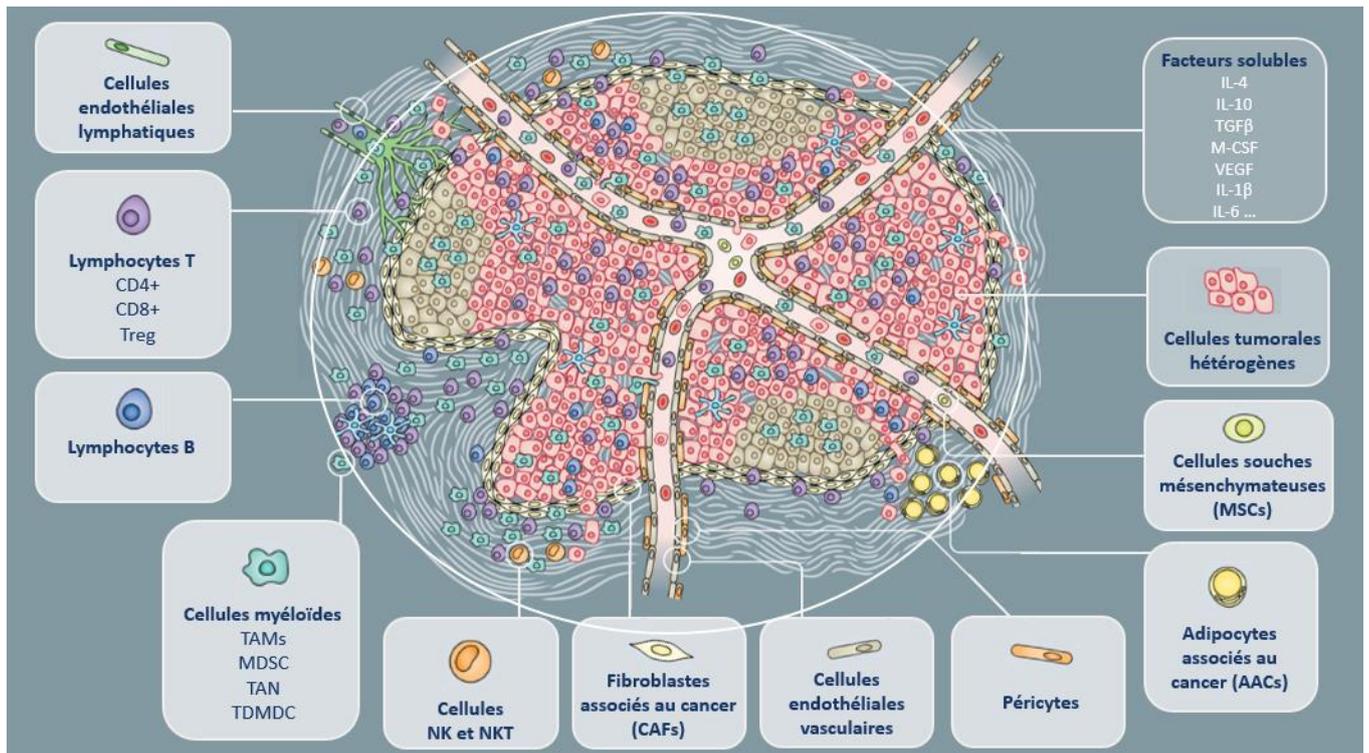
2. Influence des populations cellulaires stromales sur les OVs

De la même façon que les populations cellulaires du microenvironnement tumoral influencent la réponse aux traitements anticancéreux classiques, elles peuvent également jouer un rôle important dans les thérapies par OVs.

Certaines cellules du microenvironnement tumoral ont normalement pour fonction de maintenir l'équilibre immunitaire et de détecter les agents pathogènes. Par conséquent, elles réagissent également à l'infection des tumeurs par les OVs. Dans un premier temps, les fonctions phagocytaires des cellules myéloïdes infiltrantes peuvent induire une clairance rapide du virus. Ainsi, l'injection d'un HSV-1 oncolytique dans des glioblastomes déclenche une augmentation des marqueurs myéloïdes CD68 et CD163. L'élimination de ces populations infiltrantes a multiplié respectivement par 10 et par 5 les titres viraux dans les tumeurs⁴¹⁵. Par ailleurs, les cellules myéloïdes sont capables de fournir une réponse IFN I fonctionnelle face aux infections virales dont l'action paracrine protège aussi les cellules tumorales. Ainsi, les cellules CD68+ résidant dans des tumeurs ovariennes et mammaires induisent un état antiviral protecteur contre l'infection par un VSV oncolytique. L'inhibiteur de la signalisation IFN de type I (JAK1/2), le ruxolitinib, a permis de sensibiliser ces tumeurs à la réplication du VSV⁴¹⁶. La présence d'autres populations cellulaires du microenvironnement semble au contraire favoriser la réplication virale⁴¹⁷.

Ainsi, l'expression du facteur de croissance des fibroblastes 2 (FGF2 : *fibroblast growth factor 2*) par les fibroblastes associés au cancer (CAF : *cancer-associated fibroblast*) augmente de manière significative la réplication de différents virus oncolytiques (VV, VSV, HSV-1, Maraba virus et Réovirus) dans les cellules cancéreuses pancréatiques dans un modèle de coculture ainsi que dans plusieurs

modèles de xénogreffes. En effet, le FGF2 semble induire la baisse d'expression de RIG-I chez les cellules tumorales, entravant leurs capacités à détecter les OV^s⁴¹⁸. Par ailleurs, la mort de certaines populations cellulaires stromales induite par leur infection est un des effets antitumoraux direct de la thérapie par OV^s. Par exemple, l'expression de VEGF par des cellules tumorales ovariennes induit l'augmentation de l'expression de HVEM, le principal récepteur du HSV-1, par les cellules endothéliales vasculaires de la tumeur. Ainsi, après inoculation intravasculaire du virus, des glycoprotéines virales ont été détectées en association avec l'endothélium tumoral, mais pas avec l'endothélium vasculaire d'autres organes. La sensibilité accrue de l'endothélium vasculaire tumoral a eu un effet anti-angiogénique direct sur la tumeur, améliorant l'efficacité oncolytique du virus⁴¹⁹.



<p>Cellules endothéliales lymphatiques</p> <p>La production de VEGFC ou de VEGFD par les CTs stimule la croissance des vaisseaux lymphatiques qui favorisent la croissance tumorale, le recrutement de cellules immunitaires et les métastases.</p>	<p>Cellules souches mésenchymateuses (MSCs)</p> <p>Aident à la transformation pro-tumorale des autres types cellulaires, notamment des CAFs, des péricytes et des adipocytes.</p>
<p>Lymphocytes T</p> <p>CD4+ Th1 /CD8+/Tγδ Associées à un bon pronostic, leurs fonctions immunostimulantes et cytotoxiques sont la plupart du temps inhibées ou altérées.</p> <p>Treg (LT régulateurs)/ CD4+ Th2/TH17 Associées à un mauvais pronostic, leurs actions immunosuppressives permettent l'échappement immunitaire de la tumeur.</p>	<p>Adipocytes associés au cancer (AACs)</p> <p>Soutiennent la croissance des cellules tumorales en fournissant les acides gras nécessaires à leurs besoins métaboliques.</p>
<p>Lymphocytes B</p> <p>Habituellement retrouvés en marge de la tumeur ou dans des organes lymphoïdes tertiaires adjacents, ils sont associés à un bon pronostic. Les sous-types B10 ou Breg peuvent être immunosuppressifs notamment par leur production d'IL-10.</p>	<p>Péricytes</p> <p>Maintenant la structure vasculaire, leur faible couverture des vaisseaux tumoraux facilite l'angiogénèse et la formation de métastases.</p>
<p>Cellules myéloïdes</p> <p>TAMs (Tumor associated macrophages) Immunosuppressives notamment vis-à-vis des LT CD8+ mais également par leur production cytokinique (IL-10, IL-4, IL-13, PGE2). Induisent l'angiogénèse et facilitent la croissance tumorale.</p> <p>MDSC (Myeloid derived suppressive cells) Produisent de larges quantités d'IL-10 immunosuppressive, aident à la polarisation des autres cellules vers des phénotypes pro-tumoraux et inhibent les fonctions cytotoxiques des LT CD8+.</p> <p>TAN (Tumor associated neutrophils) Pro ou anti-tumoraux, fonctions controversées et cancer-dépendantes.</p> <p>TDMDC (Terminally differentiated myeloid dendritic cells) Leurs fonctions présentatrices d'antigènes sont souvent altérées.</p>	<p>Cellules endothéliales vasculaires</p> <p>La production de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF, notamment par les CTs, les CAFs et les MSCs, stimulent la production de nouveaux vaisseaux. Leur architecture bien qu'anarchique, permet l'apport d'oxygène et de nutriment à la tumeur.</p> <p>Fibroblastes associés au cancer (CAFs)</p> <p>Permettent le remodelage constant l'ECM par leur production de matrice et de protéases. Favorisent la croissance tumorale par stimulation cytokinique. Peuvent avoir des fonctions immunosuppressives.</p> <p>Cellules NK et NKT</p> <p>Associées à un bon pronostic, leurs cytotoxiques sont la plupart du temps inhibées ou altérées.</p>

Figure 11 : Cellules du micro-environnement tumoral. D'après Frances R. Balkwill et Al¹⁷⁵. Les nombreux facteurs solubles sécrétés par la tumeur permettent le recrutement et la différenciation de différents types cellulaires.

Pour conclure, la propriété première d'un virus oncolytique est d'infecter spécifiquement et de lyser les cellules tumorales. Néanmoins, cette propriété, testée principalement sur des cellules cultivées en laboratoire, se heurte aux réalités physiologiques de la tumeur. Dans leur contexte, les cellules tumorales présentent bien souvent des sensibilités particulières aux virus oncolytiques. Néanmoins, elles évoluent dans un environnement complexe et contraignant, en constante évolution et en communication avec d'autres types cellulaires. Les éléments abordés dans cette partie non exhaustive sur les mécanismes de sensibilité et de résistance des tumeurs aux OV_s pourraient expliquer l'efficacité encore limitée de la virothérapie chez les patients cancéreux humains malgré des résultats prometteurs chez les animaux. A travers les efforts de recherche menés afin d'élucider les mécanismes à l'origine de la réussite des traitements par OV_s, une problématique globale semble se dégager. Cette problématique est celle d'un équilibre entre la réplication virale initiale et la réponse immunitaire antitumorale et inévitablement antivirale qui s'ensuit⁴²⁰. L'étude de cet équilibre ne peut se faire qu'à travers des modèles cellulaires plus complexes, intégrés et respectant d'avantage la biologie de la tumeur que les cultures cellulaires classiques en deux dimensions.

4. Les modèles 3D

A. Généralités et nomenclature

Le développement des modèles de culture en 3D ces dernières années offre des outils précieux pour la recherche biomédicale⁴²¹. Contrairement aux cultures cellulaires traditionnelles, qui se développent sur une surface plane, les cultures en 3D permettent aux cellules de croître dans un environnement tridimensionnel où les interactions entre-elles et leur environnement reflètent bien mieux les tumeurs *in vivo*. Ces modèles se situent à l'interface entre les modèles de cultures classiques peu physiologiques et les modèles animaux. Devant la volonté éthique de réduire l'utilisation des modèles animaux mais également face aux différences physiologiques entre espèces, ils sont utilisés pour étudier divers aspects du développement et de la fonction des tissus, ainsi que pour tester l'efficacité et la toxicité des médicaments dans des contextes précis. En effet, il existe une grande variété de méthodes de cultures 3D dont les caractéristiques particulières présentent chacune des avantages et des limites (**Figure 12**). Leur utilisation éclairée permet d'élucider les problématiques nécessitant un niveau d'intégration supérieur à celui de la culture cellulaire classique mais pas forcément aussi poussé que celui d'un organisme entier. Grâce à ces méthodes de cultures en 3D, différents modèles ont été développés. Leur nomenclature étant encore fluctuante, je vais tenter de les classer simplement et d'en donner une définition se rapprochant des consensus actuels.

Les explants cellulaires consistent en la culture de biopsies déposées ou incluses dans des matrices, majoritairement naturelles, et recouvertes de milieu de culture. Cette méthode permet la conservation de l'architecture tissulaire, comprenant les composants cellulaires et matriciels. Néanmoins, l'hétérogénéité des tissus biopsiés peut donner des résultats très aléatoires, et des phénomènes de nécroses peuvent gêner les investigations longues⁴²². Ces modèles se sont particulièrement développés dans le domaine de la cancérologie. Dans le cadre du MPM, ce mode de culture est particulièrement difficile à mettre en œuvre car la chirurgie de ce cancer est rare et les biopsies, de petite taille, servent essentiellement au diagnostic anatomo-pathologique.

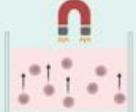
Sans matrice		Avec matrice	
 <p>Goutte suspendue</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Production élevée • Faible coût • Récupération facile • Reproductibilité moyenne • Cultures courtes car peu de milieu • Pas d'analyse <i>in situ</i> 	 <p>Simple inclusion</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Facile et faible coût • Reproductible • Récupération facilitée • Analyses <i>in situ</i> difficiles • Cultures courtes • Possible propagation en 2D
 <p>Lévitation magnétique</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Analyses <i>in situ</i> • Récupération facilitée • Cultures longues • Production limitée • Nécessite un pré-traitement avec des billes magnétiques chères et parfois toxiques 	 <p>Encapsulation</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Faible coût • Très reproductible • Récupération facilitée • Production élevée • Pas d'analyses <i>in situ</i> • Croissance réduite • Phénomène de nécrose
 <p>Culotage</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Facile • Faible coût • Maximise les interactions cellulaires • Analyses <i>in situ</i> • Récupération facilitée • Cultures longues • Faible production • Shear stress par centrifugation 	 <p>Bio-impression</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Très reproductible • Façonnable à souhait • Analyses <i>in situ</i> • Coût important • Faible production • Difficile à mettre en oeuvre
 <p>Surfaces non adhérentes</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Facile • Coût modéré • Reproductible • Récupération facilitée • Cultures longues • Production importante • Analyses <i>in situ</i> 	 <p>Plaques à micro-motifs</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Facile • Coût modéré • Très reproductible • Récupération facilitée • Analyses <i>in situ</i> • Production importante • Croissance réduite • Phénomène de nécrose
		 <p>Fluidique et micro-fluidique</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Difficile à mettre en oeuvre • Coût important • Reproductibilité moyenne • Récupération difficile • Analyses <i>in situ</i> • Production faible • Très physiologique
		 <p>Flacon centrifuge</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Faible coût • Pas de restriction de taille • Cultures longues • Récupération facilitée • Faible production • Risque de nécrose • Grande hétérogénéité
			<p>Matrices</p>
			<p>Naturelles</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Faible coût • Biodégradables • Variabilité de composition et de propriété • Difficultés de manipulation • Bons supports d'adhésion et de migration cellulaire • Très physiologiques
			<p>Synthétiques</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Composition stable • Façonnable • Libération de composés toxiques • Perte de signalisation cellulaire • Peu d'adhésion et de migration cellulaire
			<p>Métalliques</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Composition stable et qui ne change pas dans le temps • Solide et réutilisable • Pas de signalisation cellulaire • Peu physiologique
			<p>Céramique/ Verre bio-actif</p> 
			<p>Nanotubes de carbone</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Composition stable • Solide et réutilisable • Adhésion cellulaire • Compatible avec la microscopie électronique

Figure 12 : Principales méthodes de culture 3D. Les cellules peuvent être cultivées en 3D sous différentes modalités, dans des milieux de culture classiques ou dans différents types de matrices. Les méthodes de culture peuvent être exclusives, évoluer au cours du temps ou être combinées. La taille et la complexité des cultures dépendent par ailleurs de la cinétique de croissance des différents types de cellules, de la densité cellulaire lors de l'ensemencement et de la durée de la culture^{403,438,439}.

Les organoïdes sont des modèles de culture 3D dérivés de cellules souches. Ils forment des unités structurales ressemblant partiellement un organe, à la fois en termes de structure et de fonctions. Ces modèles nécessitent la présence d'une matrice extracellulaire et l'exposition séquentielle à différents facteurs de croissance afin d'orienter le processus de différenciation. Les structures complexes et différenciées sont relativement longues à obtenir (2/3 mois). Ces modèles concernent essentiellement les études portant sur les processus d'organogénèse, les pathologies génétiques et des maladies infectieuses⁴²³. Néanmoins, la formation de tumoroïdes en cancérologie peut s'apparenter à la formation d'un sous-type d'organoïde tumoral. Ce terme concerne différents types de cultures mais qui sont toutes incluses dans des matrices. Cette dénomination désigne la culture d'une petite quantité de cellules sur le long terme, simulant le développement tumoral. L'utilisation de cellules souches cancéreuses (CSC), une sous-population de cellules tumorales qui peuvent être à l'origine de l'initiation de la tumeur, peut par ailleurs être retrouvée. De nombreux modèles de tumoroïdes incluent également la mise en culture en matrice de biopsies dissociées, comprenant donc le microenvironnement cellulaire tumoral⁴²⁴. Le terme de sphéroïde est ensuite souvent retrouvé de façon interchangeable avec celui de « tumoroïde » dans la littérature. Néanmoins, les sphéroïdes désignent le plus fréquemment des agrégats cellulaires en milieu liquide. Ces cultures sans matrices, souvent de courte durée, peuvent contenir différents types cellulaires et reflètent principalement l'organisation spatiale des tumeurs et leurs contraintes physiques. Les sphéroïdes flottants peuvent ensuite être utilisés dans d'autres modes de culture, incluant des matrices ou des puces⁴²⁵.

B. Les sphéroïdes tumoraux

1. Mécanismes de formation

De nombreux types cellulaires tumoraux ont la capacité de s'assembler spontanément en sphéroïdes lorsqu'ils sont placés dans un environnement favorisant les contacts cellulaires. Le processus de formation des sphéroïdes comporte trois phases. Dans un premier temps, les sphéroïdes tumoraux se forment par un processus d'agrégation initial dans un milieu de culture liquide. Ce phénomène d'auto-assemblage se produit naturellement au cours de l'embryogenèse, de la morphogénèse et de l'organogénèse⁴²⁶. Il peut se faire par grappes, lorsque les

cellules mono-dispersées forment des compartiments se déposant et s'agrégant. Il peut aussi se faire selon un modèle de collision dans lequel les cellules s'entrechoquent pour former les sphéroïdes⁴²⁷. Ce sont notamment les fibres de la matrice extracellulaire qui encouragent l'agrégation préliminaire, particulièrement par liaison aux intégrines transmembranaires⁴²⁸.

Dans un second temps, il apparaît de plus en plus clairement que ce sont les molécules d'adhésion de surface et le réseau cytosquelettique qui agissent de concert pour contrôler et faire évoluer les processus d'auto-assemblage. Notamment, la E-cadhérine, une molécule d'adhésion transmembranaire, favorise une forte adhésion de l'agrégat cellulaire initial tandis que le complexe β -caténine facilite la transduction des signaux cellulaires^{428,429}. Par ailleurs, il a été montré que des drogues ciblant le complexe actine-myosine ralentissent à la fois le taux d'auto-assemblage des cellules mais modifient également leurs activités spécifiques⁴³⁰.

Enfin, la troisième étape consiste en une phase de croissance du sphéroïde durant laquelle se précise le microenvironnement cellulaire, aux interactions complexes, notamment en terme de signaux paracrines et mécaniques. On retrouve des organisations très hétérogènes en fonction des modes et milieux de culture ainsi que des composants cellulaires les formant, allant de couches concentriques définies et compactes à des agrégats lâches et ovoïdes, en passant par des structures en forme de donuts⁴³¹.

2. Caractéristiques des sphéroïdes tumoraux

La culture sous forme de sphéroïdes offre la possibilité de reproduire en partie la complexité structurelle et fonctionnelle des tumeurs⁴²². Tout d'abord, l'organisation concentrique des cellules crée un ensemble de gradients de concentrations très similaire à celui retrouvé *in vivo*. Ainsi, les cellules périphériques des sphéroïdes, tout comme les cellules les plus proches des vaisseaux sanguins dans la masse tumorale, ont un meilleur accès aux constituants solubles, nutriments et oxygène. Cet accès diminue au fur et à mesure de la diffusion à travers la matrice extracellulaire jusqu'au cœur de la tumeur ou du sphéroïde. Ces différents gradients influencent profondément les fonctions cellulaires, la prolifération, la morphogénèse et la signalisation au sein du microenvironnement⁴³².

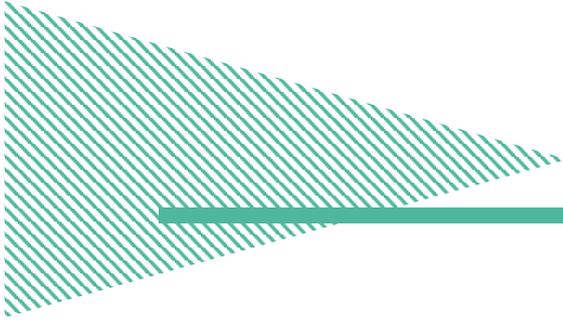
Tout d'abord, les gradients en facteurs solubles ont un très fort impact sur l'activité des cellules et leur métabolisme. Ainsi, les cellules cultivées en sphéroïdes se retrouvent à différents états prolifératifs basés sur l'accès aux nutriments et à l'oxygène, qui est limité par le gradient de concentration. De la périphérie au cœur du sphéroïde, on trouve la zone proliférative externe, la zone quiescente semi-périphérique et la zone nécrotique centrale⁴³³. Cette différence d'activité cellulaire se manifeste notamment par la mise en place de gradients inversés concernant les métabolites comme le lactate ou les déchets comme le dioxyde de carbone⁴³⁴.

Ensuite, les cellules placées dans ces structures tridimensionnelles présentent une hétérogénéité, des profils d'expression génique et des voies de signalisation beaucoup plus réalistes. Ainsi, des cellules de MPM cultivées en 3D ont montré une augmentation des jonctions serrées intercellulaires ainsi que de l'expression des marqueurs immuno-histochimiques typiques du MPM, les rapprochant d'avantage des biopsies tumorales par rapport à la culture 2D⁴³⁵. De fait, les sphéroïdes sont des modèles de prédilection pour l'étude des interactions cellulaires, particulièrement entre les cellules tumorales et l'infiltrat immunitaire. Notre équipe a notamment pu mettre en évidence l'implication directe des cellules MPM dans la formation de macrophages immunosuppresseurs dans un modèle de coculture en sphéroïde par l'activation de la voie du récepteur du facteur de stimulation des colonies 1 (CSF1-R : *colony stimulating factor 1 receptor*). Ces cellules immunosuppressives provoquent l'inhibition de la cytotoxicité de LT CD8+ spécifiques d'un antigène exprimé par les cellules tumorales⁴³⁶. Les sphéroïdes sont également particulièrement utilisés pour étudier les résistances intrinsèques aux traitements de nombreux cancers. En effet, les structures 3D sont depuis longtemps décrites comme présentant des résistances accrues aux médicaments anticancéreux, se rapprochant de celles retrouvées chez les patients⁴³⁷. Certaines équipes utilisent notamment des organoïdes et sphéroïdes tumoraux dérivés de patients atteints de MPM afin d'effectuer des tests à grande échelle de médicaments dans l'objectif de mettre en place une médecine personnalisée^{438,439}.

Enfin, la structure tridimensionnelle des sphéroïdes imite l'architecture tissulaire *in vivo*, permettant des interactions complexes entre les cellules et la matrice extracellulaire. Notamment, il a été montré que les forces de traction dynamiques de la matrice jouent un rôle crucial dans le phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse à l'origine des métastases⁴³³. Ainsi, une étude transcriptomique

sur des sphéroïdes de MPM a révélé une augmentation de l'expression des gènes en lien avec les processus biologiques de mouvement, de signalisation de cellule à cellule, de prolifération cellulaire et de morphologie par rapport aux cultures 2D⁴⁴⁰. Par ailleurs, la dégradation et le remodelage de la matrice sont des facteurs clés de la malignité invasive. De ce fait, les sphéroïdes sont des outils précieux pour l'étude des capacités d'invasion des cellules tumorales. Il a notamment été montré que les différents sous-types de MPM n'ont pas la même capacité d'invasion de la matrice lorsqu'ils sont cultivés en 3D, tandis que cette capacité est similaire en 2D⁴⁴¹.

Pour conclure, l'émergence récente des techniques de culture en 3D offre l'opportunité d'étudier la biologie de la cellule et des tissus dans un contexte plus intégratif tout en palliant aux lacunes des autres modèles précliniques. Récapitulant certaines conditions physiopathologiques, ces modèles sont notamment particulièrement prometteurs dans l'identification de biomarqueurs potentiels mais aussi dans la mise en place d'une médecine personnalisée afin de mieux cibler les thérapies.



HYPOTHESES ET OBJECTIFS

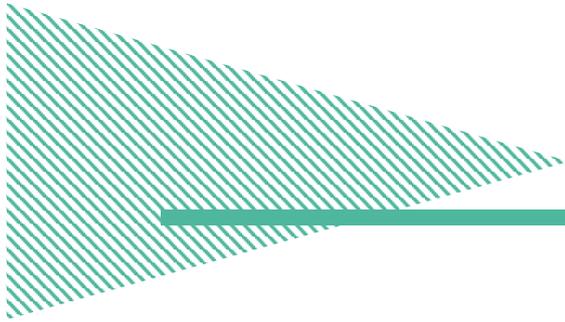
Le MPM est un cancer agressif et réfractaire aux traitements conventionnels. Il est donc nécessaire de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques. C'est dans cet objectif que notre équipe étudie la virothérapie oncolytique. Nous étudions notamment les mécanismes de sensibilité des cellules tumorales aux OV's et leurs effets sur la réponse immunitaire antitumorale. Lors de ma thèse, j'aborde ces deux thèmes.

Tout d'abord, ma principale thématique de recherche a été l'étude des mécanismes de résistance des cellules tumorales à l'activité oncolytique de la souche Schwarz du MV lorsque les cellules tumorales sont cultivées en 3 dimensions sous forme de sphéroïdes. Par le passé, l'équipe a montré un rôle prépondérant de la réponse IFN de type I dans la résistance des cellules tumorales et des cellules saines à la réplication du MV^{22,276,442}. L'équipe a montré dans un modèle de culture classique qu'une majorité de lignées tumorales de MPM et de mélanome sont sensibles à l'activité oncolytique du MV car elles présentent des défauts de cette réponse. L'équipe a ensuite mis au point un modèle d'étude de ces différentes lignées de MPM en 3 dimensions⁴³⁶. Les lignées tumorales, pouvant être associées à des cellules saines caractéristiques du microenvironnement tumoral, sont cultivées sur des surfaces non adhérentes facilitant les contacts cellulaires et donc l'agrégation des structures sous forme de sphéroïdes. L'équipe a notamment pu montrer dans ce modèle que les monocytes au contact des cellules tumorales de MPM se différencient en macrophages immunosuppresseurs. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la sensibilité ou la résistance des lignées de MPM au MV pourraient être modifiées dans ce modèle de sphéroïdes. L'objectif de la majeure partie de ma thèse est donc d'étudier les capacités oncolytiques du MV dans les sphéroïdes de MPM.

Ensuite, lors de mon stage de master 2 et le début de ma thèse, j'ai co-étudié dans un modèle de culture classique, avec Mohamed Idjellidaine le MVny, une souche MV Schwarz, construite par l'équipe du Dr Tangy, codant pour le *cancer testis antigen* (CTA) *New York esophageal squamous cell carcinoma 1 antigen* (NY-ESO-1). Il s'agit d'un antigène spécifique de tumeur capable d'être reconnu par les anticorps et les lymphocytes T CD4+ et CD8+ de patients. L'équipe a largement étudié la façon dont l'infection par le MV peut amener le système immunitaire à produire une réponse antitumorale, notamment à travers l'induction d'une mort cellulaire immunogène. L'équipe a notamment montré que le MV Schwarz, lorsqu'il provoque la lyse des

cellules de mélanome, induit la libération d'antigènes tels que NY-ESO-1. Les DC plasmacytoïdes (pDC) et les DC dérivées de monocytes sanguins (Monocytes-derived DC, Mo-DC) sont alors capables de faire une présentation croisée de l'antigène NY-ESO-1 provenant de cellules tumorales infectées par le MV à des cellules T CD8+ cytotoxiques spécifique⁷⁴. Cependant les niveaux de présentation croisée restent relativement faibles. Plus récemment, l'équipe a montré que NY-ESO-1 peut aussi être capturé par des cellules tumorales voisines vivantes, dans lesquelles il atteint la voie de présentation HLA de classe II exogène classique, potentialisant la reconnaissance directe de ces cellules tumorales par les cellules T CD4+ effectrices spécifiques⁴⁴³. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le MV Schwarz génétiquement modifié pour exprimer l'antigène NY-ESO-1 (MVny) permettrait d'augmenter le niveau de présentation HLA global de NY-ESO-1 par les cellules tumorales et les DCs, dans le but de stimuler des lymphocytes T spécifiques. L'objectif de cette étude a donc été de d'évaluer la capacité du MVny par rapport au MV non modifié à faire présenter le peptide issu de l'antigène NY-ESO-1 par des DCs et des cellules tumorales à des clones de lymphocytes T CD4+ et CD8+.

Dans une première partie seront présentés sous forme d'article scientifique les résultats majeurs concernant l'analyse des facteurs de résistance des sphéroïdes de MPM au MV oncolytique. Dans une seconde partie, je présenterai des résultats complémentaires à cette étude, précisant certaines caractéristiques du modèle utilisé. Dans une troisième partie seront enfin présentés les résultats obtenus pour l'étude du MVny. L'ensemble de ces résultats seront ensuite discutés lors du dernier chapitre de ce manuscrit.



RESULTATS

1. Reduced proliferation of mesothelioma cell lines cultured as spheroids decreases replication of oncolytic attenuated measles virus

Les résultats de la première partie de nos travaux sont présentés ici sous la forme d'un article scientifique.

Reduced proliferation of mesothelioma cell lines cultured as spheroids decreases replication of oncolytic attenuated measles virus

Marion Grard^{1,2}, Camille Chatelain^{1,2}, Laurine Berland^{1,2}, Chantal Combredet³, Sophie Deshayes^{1,2}, Virginie Dehame^{1,2}, Judith Fresquet^{1,2}, Delphine Fradin^{1,2}, Christophe Blanquart^{1,2}, Nicolas Boisgerault^{1,2}, Frédéric Tangy³ and Jean-François Fonteneau^{1,2}.

¹ Nantes Université, Inserm, CNRS, Université d'Angers, CRCI2NA, Nantes - France

² Labex IGO, Immunology Graft Oncology, Nantes, France

³ CNRS 3569, Institut Pasteur, Paris, 75015, France.

Corresponding author: Jean-François FONTENEAU, CRCIN2A, INSERM UMR1307, CNRS UMR6075, Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes, 8 quai Moncoussu, BP 70721, 44007 Nantes cedex 1

Email: jean-francois.fonteneau@inserm.fr

Short Title: decreased MV replication in mesothelioma spheroids

Abstract

Antitumor virotherapy is under investigation for the treatment of malignant pleural mesothelioma (MPM). In 2-dimensional (2D) monolayer cultures, the majority of MPM cell lines are sensitive to the oncolytic activity of Schwarz-attenuated measles virus (MV) due to defects in their antiviral response to type I interferon (IFN I). In this study, we cultured these cell lines in 3-dimensional (3D) spheroids to mimic the architecture of real tumors and we evaluated MV replication and oncolytic activity. In a majority of MPM cells lines (6/8), MV replication is absent in 3D cultures, even in presence of ruxolitinib, a JAK1/2 inhibitor that block IFN-alpha/-beta receptor (IFNAR). Replication was observed in 3D cultures of the two other MPM cell lines and was limited to the surface of the spheroid. We then compared transcriptomic programs of four MPM cell lines cultured in 2D or 3D conditions. We observed a reduction of cell cycle genes expression and an increase of the extracellular matrix and the inflammatory (IL-17/TNF/NF-kB pathways) genes expression in 3D conditions. By analysis of the cell cycle, we confirmed that MPM tumor cells are dormant inside the spheroid. Finally, we observed with different treatments (serum deprivation, synchronized restart of the cell cycle, epithelial growth factor) that reduce or increase the cell cycle that MV replication was proportional to the number of cells in proliferation. Our study suggests that MV oncolytic activity is reduced by tumor cell dormancy and that viral replication should be more important in parts of the tumor where cells divide.

Key words: Antitumor virotherapy, oncolytic virus, measles virus, malignant pleural mesothelioma, 3D culture, spheroids

Introduction

Mesothelioma is an aggressive cancer developed from the mesothelial cells of the mesothelium of the pleura[1]. Usually associated with chronic exposure to asbestos, its incidence is increasing despite the ban on its use in Western countries, the time for the onset of the disease after exposure generally being greater than 30 years[2]. The absence of symptoms at the start of the disease makes the diagnosis very late, with a reduced lifespan.

Current treatment mainly includes chemotherapy, targeted therapy including Immune checkpoint inhibitor and more rarely surgery. But these conventional therapeutic modalities have limited efficacy and are rather considered as palliative[3]. There is an urgent need of new therapeutic approaches because survival 5 years after the diagnosis is around 7%.

Antitumor virotherapy using replicative oncolytic viruses (OVs) is an emerging approaches to treat cancer[4]. OVs replicate specifically in tumor cells and induce immunogenic cell death that stimulates the antitumor immune response[5]. Among OVs, attenuated strains of measles virus (MV) that are used for children vaccination display a spontaneous oncolytic activity against numerous types of cancer[6]. This activity was attributed to the overexpression on tumor cells of CD46, a complement regulating protein that is also an entry receptor for attenuated MV[7]. Attenuated MV is sensitive to the antiviral type I interferon (IFN I) response and we showed that its oncolytic activity in MPM cells depends of IFN I production or IFN- α / β receptor (IFNAR) signalling[8]. More recently we identified the most frequent defects of IFN I response in MPM cells as the homozygous deletion of all genes encoding IFN I that are found in 23% of patients[9]. Attenuated MV is under clinical studies in several cancers and encouraging results have been obtained in ovarian cancer and myeloma[10]. Furthermore, in a phase I clinical trial against glioblastoma and in preclinical mouse models, the constitutive activation of the IFN I pathway is the main resistance factor to attenuated MV[11].

In vitro studies of MPM cell lines permissiveness to MV replication in classical 2 dimensional (2D) monolayer cultures likely do not reflect MV permissiveness in real 3 dimensional (3D) tumors. The primary property of an oncolytic virus is to specifically infect and lyse tumor cells. Nevertheless, this property, tested mainly on cells cultured in the laboratory, comes up against the physiological realities of the tumour. In their context, cells

evolve in a complex and constraining environment, in constant evolution and in communication with other cell types. To mimic in vitro MPM tumors, we set up a method to culture MPM cell lines under the form of 3D spheroids[12]. 3D cultures of tumor cell lines has been shown to better reflect tumors[13, 14]. In this study, we compared the permissiveness to MV replication of eight MPM cell lines that were cultured in 2D monolayer or 3D spheroids. We observed a strong decrease of MV replication in spheroids that was independent of the IFN I response. By comparing transcriptome of four 2D- or 3D-cultured MPM cell lines, we showed that in spheroids, expression of protein implicated in the tumor cell proliferation was reduced, while expression of inflammatory and extra cellular matrix protein were increased. We then confirmed that tumor cells replicate less in spheroids and that their permissiveness to MV replication is correlated to tumor cell replication. Our study allows to better understand MV replication in tumors that may help to increase it oncolytic activity in the future.

Materials and methods

Cell culture

MPM cell lines Meso4, Meso11, Meso13, Meso31, Meso34, Meso61, Meso173, and Meso225 were established and genetically characterized in the laboratory from pleural effusions obtained by thoracocentesis as previously described¹ and registered in the Biocollection DC-2011-1399 with informed consent from patients. The Human melanoma cell line M18 was established from fragments of metastatic tumors and registered in the Biocollection PCU892-NL (CHU Nantes, France) with informed consent from patient. Cell lines were grown in Roswell Park Memorial Institute Medium-1640 (RPMI) supplemented with 2 mM L-Glutamine, 100U/mL Penicillin, 100µg/mL Streptomycin (Gibco-Invitrogen) and 10% decompemented Fetal Calf Serum (FCS) at 37°C, under 5% CO₂ and 100% humidity. Cells were routinely checked for Mycoplasma contamination (PlasmoTestTM, InvivoGen).

Measles oncolytic virus

The live-attenuated Schwarz vaccine strain of measles virus (MV) and MV recombinant for the enhanced green fluorescent protein (MV GFP) were produced as previously described[15].

Tumor Spheroids formations

Tumor spheroids were formed with MPM cells lines as previously described[12]. Briefly, MPM cell lines were seeded in wells of 96 U Bottom Plates NUNCLON SPHERA (Thermo Scientific) and in 180 µL of their culture medium. The plate were centrifuged 1 minute at 800 g and incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The spheroid formation was visible after 24 hours.

MV infection and replication assay

Cells were seeded in 2D flat-bottom 96-well plates in their culture medium or as spheroids as previously described (30 000 wells/well), in the presence or not of 2µM Ruxolitinib (Invivogen). Then the cells were infected or not with a MV GFP at MOI 1. Viral replication was monitored by daily measurement of GFP fluorescence using the FLUOstar

Omega reader (BMG Labtech) at a wavelength of 488nm. The fluorescent signal is normalized to the uninfected condition.

Viral titration

Cells were seeded and infected as previously described (30 000 wells/well), in the presence or not of 2 μ M ruxolitinib (Invivogen). After 3 days of infection with a MV GFP at MOI, Vero cells seeded into 96-well plates (5000 cells/well) were infected by serial 1:10 dilutions of supernatant sample from MPM infected cells in RPMI medium with FSC. GFP fluorescence at 488nm of Vero cells was analysed after 7 days of incubation at 37°C using ChemiDoc™ MP imaging system (Biorad). The TCID50 was then calculated by the Kärber method[16].

Cell viability assay

Cells were seeded and infected as previously described (30 000 wells/well), in the presence or not of 2 μ M ruxolitinib (Invivogen). After 3 days of infection with a MV GFP at MOI 1, cell viability was measured using CellTiter-Glo® Assay (Promega), an assay reagent which measures ATP as an indicator of viability and generates a luminescent readout. The luminescent signal was normalized to the uninfected condition.

Confocal microscopy

2D Cells were seeded in IDIBltreat plaque (80826) (30 000 wells/well) in the presence of 2 μ M Ruxolitinib (Invivogen). After 24 hours, cells were infected with a MV GFP at MOI 1. 3 days after the infection cells were fixed with Phosphate buffered saline (PBS) 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences) at room temperature (RT) for 10 minutes. After a washing, nucleus were labelled with 5 μ g/ml of Hoescht 33342 (Sigma) in PBS 0,1% Bovine Serum Albumine (BSA) (Sigma) and 0,1% Triton (Merk) for one hour. Then, cells were washed and the Hoescht and GFP fluorescent pictures were taken with a Nikon A1rHD LFOV confocal microscope, objective x25. The processing and analysis of the images were done with the ImageJ software.

3D were seeded as previously described, in the presence of 2 μ M Ruxolitinib (Invivogen). After 2 days, 3D cells are treated or not with human Endothelium Growth Factor (hEGF) at 10ng/ml (ABclonal). After 24 hours, cells were infected with a MV GFP at MOI 1. After 3 days, spheroids were fixed with PBS 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy

Sciences) for 30 minutes. After washing, spheroids were permeabilized in PBS Triton 2% (Merk) for 24 hours. Cells were then labelled with 5µg/ml of Hoescht 33342 (Sigma) Hoescht in PBS 0,1% Bovine Serum Albumine (BSA) (Sigma) and 0,2% Triton (Merk) for 24 hours. Then, spheroids were transparized with Rapiclear 1.52 (SUNJIN lab).

The Hoescht and GFP fluorescent pictures were taken with a Nikon A1rHD LFOV confocal microscope, objective x25. The processing and analysis of the images were done with the ImageJ software.

3D were seeded as previously described, in the presence or not of 2µM Ruxolitinib (Invivogen). After 2 days, 3D cells were treated or not with human Endothelium Growth Factor (hEGF) at 10ng/ml (ABclonal). After 24 hours, spheroids were fixed with PBS 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences) for 30 minutes. After washing, spheroids were permeabilized in PBS Triton 2% (Merk) for 24 hours. Cells were labelled with 5µg/ml of Hoescht 33342 (Sigma), with an antibody anti-CD46 1/100eme (Biolegend 352404) or anti-Ki67 (Abcam ab66155) in PBS 0,1% Bovine Serum Albumine (BSA) (Sigma) and 0,2% Triton (Merk) for 24 hours. After 24 hours of washing, spheroids were labelled with secondary antibodies anti-mouse 647 (Biolegend 4050322), anti-rabbit 647 (Life A21245) and anti-rabbit 488 (Invitrogen A11034) for 24 hours. After 24 hours of washing, spheroids were transparized with Rapiclear 1.52 (SUNJIN lab) and were imaged as previously described.

Flow cytometry

3D cells were seeded as spheroids as previously described (30 000 wells/well). After 2 days, 3D cells were treated or not with human Endothelium Growth Factor (hEGF) at 10ng/ml (ABclonal). 2D cells were cultured in 6 wells plates for 24 hours (300 000 cells/well) with serum or not. After 24 hours, some 2D cells cultured without serum were then pulsed with a medium with serum during 24 hours. Cells were then infected or not with a MV GFP at MOI 1 for 3 days.

Cells were harvested and spheroids were dissociated with tryPLE (GIBCO). After a washing, cells are incubated at 4°C in the dark for 30 minutes with an antibody solution comprising an anti-CD46 FITC (BD 555949 / Isotype IgG2ak (BD 555573)), an anti-CD150 PE (BD 559592 /Isotype IgG1k (BD 555749)) and an anti-Nectin-4-APC (R&D FAB2659A / Isotype IgG2b (ICOO41A)) diluted 1:50 in PBS 0.1% BSA. After wash, the fluorescence of the labels and

the GFP fluorescence of the MV were done by flow cytometry with the Fortessa LSR (BD Bioscience) of the Cytocell platform on a total of 10,000 cells cells selected on the basis of their size and granulometry for each condition. The FlowJo software was used to analyze the collected data.

DGE sequencing 3'UTR

Cells were seeded in 2D and 3D and infected as previously described (30 000 wells/well). After 3 days of infection, mRNA were extracted using Nucleospin RNA plus® assay (Macherey Nagel 470984.250). They were then analysed by 3'seq-RNA Profiling (GenoBird, IRS-UN, Nantes, France) using a NovaSeq 6000 (Illumina). The raw sequence reads were filtered based on quality using FastQC. Adapter sequences were trimmed off the raw sequence reads using Cutadapt. Reads were then aligned to the reference genome using BWA. Differential expressions are detected with the DESeq Bioconductor package[17].

Cell cycle analysis

2D and 3D cells as spheroids were seeded as previously described (30 000 wells/well). After 2 days, 3D cells were treated or not with human Endothelium Growth Factor (hEGF) at 10ng/ml (ABclonal). 2D cells were cultured in 6 wells plates for 24 hours (300 000 cells/well) with serum or not. After 24 hours, some 2D cells cultured without serum were then pulsed with a medium with serum during 24 hours. Then, cells were harvested and nucleus were labelled by the DAPI staining of the Two-step cycle Nucleocounter® assay. Cell cycle phases was analyzed by Nucleocounter. The FlowJo software was used to analyze the collected data.

Results

MPM cell lines grown in spheroids are less permissive to MV replication

In a first experiment, we compared MV replication permissiveness of 8 MPM cell lines that are described in table 1. Their permissiveness to MV replication in monolayer culture (2D) has already been described[8]. These cell lines were cultivated as monolayer (2D) or as spheroid (3D) and exposed to recombinant MV that encodes the green fluorescent protein (MV GFP). 3 MPM cell lines (Meso4, Meso61 and Meso173) were not permissive to MV replication. These 3 cell lines become permissive only in 2D conditions in presence of ruxolitinib that is a JAK1/2 inhibitor and thus blocks IFNAR signalling (Figure 1A). The 5 other MPM cells lines (Meso11, Meso13, Meso31, Meso34 and Meso225) were permissive to MV replication in 2D conditions and this permissiveness was increased by ruxolitinib. In 3D conditions, we observed MV replication only in Meso13 and Meso34 and ruxolitinib did not increase this replication.

To confirm these results, viral titrations were performed by the TCID50 method 3 days (Figure 1B) and 6 days (Suppl data 1) after MV infection. Results of these titrations showed a lack or a strong decrease of MV replication in spheroids conditions for the majority of the cell lines (7/8), even in the presence of ruxolitinib. In parallel, we performed a viability assay 6 days after MV infection (Figure 1C). We observed after MV infection that cell viability in 3D conditions was higher than in 2D conditions and that ruxolitinib increased tumor cell lysis in both conditions.

We then used confocal microscopy to observe MV replication in 6 MPM cell lines cultured in 2D or 3D conditions in presence of ruxolitinib. We observed that MV replication, if any, occurred in cells that are at the surface of spheroids (Figure 1D). Indeed, MV replication did not spread below the surface of the spheroids.

Finally, we performed a 3-day infection of the MPM cell line Meso13 at Day 0, Day 1, Day 2 and Day 3 of spheroid formation with MV GFP at MOI 1 with ruxolitinib (Figure 1E). Microscopy images showed a progressive decrease of MV replication capacity according to the age of the spheroid.

Altogether, these results show that under 3D conditions, there are other factors restricting MV replication that are independent of the type I interferon response.

Modulation of viral receptors CD46 expression in MPM cell lines cultured in spheroids

We compared the expression of surface receptors allowing virus entry (CD46, CD150 and Nectin-4) in the 8 MPM cell lines grown in 2D and 3D (Figure 2A). The CD46 receptor, which is the main MV entry receptor, was expressed by all 8 MPM cell lines in 2D and 3D. Whereas similar CD46 expression levels were found for Meso31, Meso34 and Meso225 cell lines under 2D and 3D conditions, these levels decreased in spheroids for Meso4, Meso11, Meso13, Meso61, and Meso173. The other two MV receptors, Nectin-4 and CD150 were not expressed by MPM cell lines.

We then analysed CD46 molecules distribution in Meso13 spheroids after transparisation by confocal microscopy (Figure 2B). We found CD46 expression at the surface of the spheroids and also inside with a lower intensity. Given that CD46 expression level is similar under 2D and 3D conditions in several MPM cell lines that loose permissiveness in 3D and that CD46 expression is expressed inside the spheroid, it is unlikely that the level of CD46 expression is implicated in the decrease of MV replication permissiveness in spheroids.

Transcriptomic analysis of MPM spheroids versus monolayer culture

In order to identify the nature of MV restriction factors in 3D, we performed a transcriptomic analysis (DGE sequencing 3'UTR) of 4 MPM cell lines cultured in spheroids or in monolayer, with or without MV infection during 3 days. We chose 2 cell lines that were resistant to MV in 3D (Meso4 and Meso31), one cell line with a decreased sensibility (Meso13) and one with similar sensibility in 2D and 3D (Meso34).

The results of the analysis showed an absence of significantly differentially expressed genes upon spheroid infection for the two resistant cell lines in 3D (Meso4 and Meso31), but also a decrease in the number of deregulated genes for the other two cell lines Meso13 and Meso34 (Figure 3A). Absence of response to MV for Meso4 and Meso31 spheroids suggests that restriction factors are induced during the spheroid formation and not in response to the virus. We thus compared the transcriptome between 2D and 3D conditions. Gene expression in 3D was largely modified compared to the 2D condition with between 3.1% and 15.3% of genes significantly deregulated depending on the tumor cell lines (Figure 3B). The main deregulated pathways in 3D were a down-regulation of cell cycle and metabolic genes

expression, an up-regulation of inflammatory pathways (IL-17, NF-kappa B and TNF), and a deregulation of expression of extracellular matrix genes (Figure 3C and 3D).

The transcriptomic analysis of MPM spheroids revealed a general decreased expression of genes that code for cell division proteins such as cyclins and cyclin-dependent kinases in the more resistant cell lines Meso4, Meso13 and Meso31. In Meso34 that remains permissive to MV replication, these cell cycle genes were rather upregulated (Figure 4A). We also observed a decrease of several metabolic pathways such as the pyruvate and amino acids metabolism when MPM cell lines are cultured in spheroids (Figure 3D). Altogether, these results suggest that some MPM cells are in dormancy when cultured in spheroids since they decrease their expression of genes that are implicated in the cell cycle and the metabolism.

We also observed activation of IL-17, NF-kB and TNF inflammatory pathways when MPM cells are cultured in spheroids, especially in the most resistant cell lines Meso4, Meso11 and Meso31 (Figure 4B). Indeed, 3D cultured cells expressed more genes with pro-inflammatory and anti-apoptotic functions such as *BCL2A1*, *IL1B*, *IL1R1*, *IL6*, *IL17RB*, *PTGS2*, *TNFRS1B*, *IKBK2* and *IKBK3*. They also expressed many chemokines genes such as *CCL11*, *CCL7*, *CSF2*, *CSF3*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*, *CXCL6*, *CXCL8* and *CXCL10*. Interestingly, we did not observe induction of expression of type I interferon genes such as *IFNB1* or *IFNA2* in 3D cultured Meso4 and Meso34 cell lines that still have both copies of these genes.

Finally, when MPM cell lines are cultured as spheroids we also observed increased expression of genes coding for proteins composing the extracellular matrix such as *COL1A1*, *COL4A2*, *COL6A1* and *COL6A2*, but also *TNC* and *FN1* (Figure 4C). Moreover, spheroid cells expressed genes coding for cell-matrix binding and communication proteins such as CD44 and CD47 or different integrins such as *ITGA1*, *ITGA2* and *ITGB8*. Finally, many genes coding for basal lamina proteins were overexpressed such as *LAMB3* and *LAMC2*.

Although these deregulated pathways in 3D cultured MPM cell lines may all be involved in the decrease permissiveness of MV replication, we decided next to investigate if the down-regulation of cell cycle plays a role.

Impact of 3D culture on cell activity and cell cycle

Since the transcriptomic analysis of MPM spheroids revealed a general decreased expression of genes that code for cell cycle proteins, especially for the resistant cell lines

(Meso4, Meso13 and Meso31), we then analysed the different phases of the cell cycle in cell lines cultured in 2D or 3D (Figure 5A and 5B). We observed that spheroid cells divide less since they present an accumulation in G0/G1 in all the 8 MPM cell lines tested. However, a small proportion of cells still divide when cultured as spheroids. In order to locate these dividing cells, we stained them with a monoclonal antibody against Ki67 and found that they are distributed mainly at the surface of the Meso13 spheroid (Figure 5C).

To determine if cell proliferation in spheroid influenced the replication of MV, different conditions that modulate the cell cycle were tested on the Meso13 cell line. Cells were cultured under 2D conditions for 24 hours without serum resulting in G0 accumulation (Figure 6A). Some of these cells cultured without serum were then re-cultured with serum during 24 hours that causes a synchronized restart of the cell cycle characterized by a strong increase of cells in the S phase. We also succeed to increase proliferation of Meso13 cells in 3D conditions by adding Endothelium Growth Factor (EGF) in the culture medium.

In order to determine whether EGF allowed a reactivation of the cell cycle in the lower layers of the spheroids, a labelling of the proliferation marker protein Ki67 was performed and observed by confocal microscopy (Figure 6B). Similar numbers of Ki67+ cells were found at the periphery of untreated and EGF-treated spheroids, whereas more Ki67+ cells were found in the centre of EGF-treated spheroids.

Finally, we repeated these cultures and cells were infected with MV GFP to measure MV replication (Figure 6C). When Meso13 cells were cultured in 2D conditions without serum, viral replication was on average diminished by half. On the other hand, when cells cultured without serum were re-exposed to it at the time of infection, viral replication increased by an average of 1.7 times. Similarly, when Meso13 cells cultured in 3D conditions were treated with EGF, viral replication was on average 7 times higher. Furthermore, the addition of EGF to the 3D culture allowed a deeper penetration of viral replication into the lower layers of the Meso13 spheroid (Figure 6D).

Altogether, our results point to a major role of the cell dormancy as a restriction factor of MV replication in tumours.

Discussion

Tumor cell lines spheroid culture is a way to take into account the three-dimensional interactions found in tumors and is a more relevant model than 2D monolayer culture for the study and characterization of novel therapy[18–21]. In this study, we used this 3D spheroid model to show that dormancy of tumor cells induces resistance to oncolytic MV replication.

In a classical 2D culture, resistance of MPM cells to the MV oncolytic activity is predominantly due to the antiviral type I interferon (IFN I) response [8, 9, 22]. A majority of MPM tumor cell lines are susceptible to MV oncolytic activity because they have defects in the IFN I pathway, including frequent homozygous deletion of the IFN I coding genes. Here we show that MPM cell lines cultured under the form of a spheroid were poorly permissive to MV replication independently of the IFN I pathway. This resistance observed in 3D culture conditions was not overcome by ruxolitinib, a JAK1/2 inhibitor that blocks IFN I receptor signalling. Furthermore, we found no significantly differentially expressed genes upon spheroid infection for 2 of the cell lines tested. This result suggests that the resistance of MPM cell lines to MV in spheroids is not due to the activation of the IFN I response and that viral restriction factors were not activated by infection but rather were acquired gradually in 3D culture. We were surprised to find that in our model the IFN I response did not play a bigger role. Indeed, it was reported by Kurokawa in a phase I clinical trial against glioblastoma and in glioblastoma and ovarian PDX mouse models that a constitutive activation of the IFN I pathway is the main resistance factor to oncolytic MV (Kurokawa C, J Natl Cancer Inst, 2018). When we analyzed the transcriptomic program of MPM cell lines that were cultured under 2D and 3D conditions, we did not find a constitutive activation of the IFN I pathway under 3D conditions. We found a diminished cell cycle protein expression and increased IL-17, NF- κ B and TNF inflammatory and ECM pathways.

Our transcriptomic analysis on 3D vs 2D conditions is in line to what have been described in other 3D models[13, 14, 21]. The observations of tumor cell dormancy, inflammation and remodelling of the ECM in 3D suggest that spheroids reflect tumors *in vivo* much better than the simple two-dimensional culture model. As in MPM, the size of our spheroids allowed us to simulate an oxygen and nutrient gradient[23]. MPM often has important areas of hypoxia, which are linked to chemotherapy resistance[24]. Although we did not see increased expression of hypoxia HIF-1 pathway genes, the presence of these

gradients induced the formation of a necrotic core in the center of our spheroids, as evidenced by deregulation of p53 signalling, inflammation and necroptosis pathways. Tumor cell necrosis is often found in MPM and is a negative prognosis marker[25]. The necrotic cells release their cytoplasmic content inducing the establishment of a strong inflammation[26], that we found in our transcriptomic study through the upregulation of TNF, NFkB and IL-17 pathways, with notably the overexpression of the pro-inflammatory cytokines IL-1b, IL-6 and TNF. Thus, the inflammatory microenvironment of spheroids particularly mimicked that of MPM, which is a cancer primarily induced by inflammation caused by the presence of asbestos fibers[27].

Hypoxia and the inflammatory environment induce the overexpression of a fibrotic-like extracellular matrix within our spheroids. Indeed, it has been shown that the lack of oxygen and heating of the microenvironment directly leads to the production of extracellular matrix proteins characteristic of scar tissue[28–30]. The main components of the fibrotic ECM found in spheroids (*COL1A1*, *COL4A2*, *COL6A1*, *COL6A2*, *TNC* and *FN1*) were particularly specific to those found in MPM. Indeed, there is an increase of type I and IV collagen by tumor cells with an anarchic expansion of the basement membrane in MPM [31]. In addition, the cells produce and gather fibronectin into fibrillar networks between them[32]. The presence of these fibronectin networks is one of the histological markers of MPM[33, 34]. Numerous preclinical studies have demonstrated that structural disruptions of tumor extracellular matrices can present real physical barriers to OV diffusion[35–37].

In this study, we also observed that in spheroids, tumor cells are dormant with a reduced number of cells entering the cell cycles and a lower metabolic activity. Cell proliferation was strongly slowed down and limited to the outer layer of the spheroid, suggesting the establishment of dormancy in the intermediate and central layers. Indeed, 3D models are commonly used to study the phenomenon of dormancy, which is associated with resistance to oncolytic viruses[38, 39]. We then showed that reducing the tumor cells proliferation by serum deprivation decreases MV permissiveness, whereas increasing it by synchronized restart of the cell cycle or EGF enhances MV replication. EGF treatment especially allows tumor cell proliferation deeper in the spheroids which correlates with MV replication that also occurs deeper in the spheroid. The dormant state was already associated with resistance to OVs in other studies [40] and seems also particularly inhospitable to MV replication in our spheroid model. Indeed, viruses are obligate intracellular parasites and

dormancy causes a decrease in cellular metabolic capacity making the factors necessary for virus replication less available.

It has been shown that dormancy induces metabolic reprogramming that is incompatible with viral replication[41]. Indeed, many viruses are known to induce metabolic reprogramming in host cells to facilitate optimal virus production, notably by increasing glycolytic metabolism which provides reducing equivalents and precursors for macromolecule biosynthesis[42]. In addition, it has been shown that some glycolysis enzymes are directly involved in the replication steps of paramyxoviruses[43]. However, we have been able to demonstrate in our spheroids a down regulation of genes involved in the glycolysis pathway. We have also demonstrated the down regulation of the pathways involved in the production of amino acids. It has been shown that the presence of certain amino acids, notably arginine, isoleucine andreonine, is essential for proper viral replication[44].

We also showed that CD46 expression decreased in 3D conditions compared to 2D for majority of MPM cell lines. Decreased expression of the LDLr viral receptor has also been described in ovarian cancer spheroids where it was responsible for the decrease in oncolytic activity of Maraba virus [40]. The other MV entry receptors, CD150 and nectin-4, were not expressed on MPM cells in either 2D or 3D, confirming our previous observations obtained on 2D-cultured MPM cell lines [8]. Nevertheless, the decrease in CD46 expression cannot fully explain the decrease in viral replication observed in 3D culture. Indeed, the infection was shown to be proportional to the density of receptors on the surface of cells, but a low density is still sufficient to allow an infection by the virus [7, 8]. In our study, some cell lines such as Meso31 and Meso225 do not loose CD46 expression on their surface in 3D, but loose their MV permissiveness. Finally, we observed that CD46 is uniformly expressed in the spheroid which does not explain the inability of MV to replicate deeply.

In conclusion, even if we cannot exclude a role for inflammation and ECM in the decreased MV permissiveness of MPM cell lines cultured under form of spheroid, our results show that tumor cell dormancy plays a role in this decrease. Further studies are guaranteed to better define the role of inflammation and ECM on MV oncolytic activity in this spheroid model.

Acknowledgments

We thank Philippe Hulin and the cellular and tissular core facility of Nantes University (MicroPiCell) for their expertise in video microscopy. We thank Nicolas Jouand and the core facility of flow cytometry from Nantes University (Cytocell). The graphical abstract was created with BioRender.com.

Founding

This work was supported by “La Ligue Régionale Grand Ouest contre le Cancer” (CD16, CD22, CD44, CD49, CD72, CD79 and CD85), “l’association ARSMESO44”, “la Fondation ARC”, “La région Pays de la Loire, trajectoire nationale”, “L’institut National du Cancer, INCA-PLBIO”, l’Agence Nationale pour la Recherche (ANR-16-CE18-0016), and “LabEX IGO” program supported by the National Research Agency via the investment of the future program ANR-11-LABX-0016-01”.

Author contributions

Experiments conception: MG, JFF and FT

Experiments: MG, CCh, CCo, SD, VD, JF, NB and JFF

Data analysis and manuscript writing: MG, DF CB, NB, FT and JFF.

Conflict of interest

FT and JFF are authors of patents on MV. FT owns equity in Oncovita, an oncolytic virotherapy company.

Keywords

antitumor immunotherapy, measles virus, melanoma, tumor antigen, NY-ESO-1, T cells.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author (jean-francois.fonteneau@inserm.fr) upon reasonable request.

References

1. Clinical Practice Guideline – Malignant Pleural Mesothelioma. <https://www.esmo.org/guidelines/guidelines-by-topic/lung-and-chest-tumours/malignant-pleural-mesothelioma>. Accessed 31 Mar 2023
2. Yap TA, Aerts JG, Popat S, Fennell DA (2017) Novel insights into mesothelioma biology and implications for therapy. *Nat Rev Cancer* 17:475–488. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.42>
3. Scherpereel A, Opitz I, Berghmans T, et al (2020) ERS/ESTS/EACTS/ESTRO guidelines for the management of malignant pleural mesothelioma. *European Respiratory Journal* 55:. <https://doi.org/10.1183/13993003.00953-2019>
4. Macedo N, Miller DM, Haq R, Kaufman HL (2020) Clinical landscape of oncolytic virus research in 2020. *J Immunother Cancer* 8:e001486. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001486>
5. Achard C, Surendran A, Wedge M-E, et al (2018) Lighting a Fire in the Tumor Microenvironment Using Oncolytic Immunotherapy. *EBioMedicine* 31:17–24. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.04.020>
6. England CE, Ungerechts G (2021) Measles Virus as an Oncolytic Immunotherapy. *Cancers (Basel)* 13:544. <https://doi.org/10.3390/cancers13030544>
7. Anderson BD, Nakamura T, Russell SJ, Peng K-W (2004) High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus. *Cancer Res* 64:4919–4926. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0884>
8. Achard C, Boisgerault N, Delaunay T, 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. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6285>
9. Delaunay T, Achard C, Boisgerault N, et al (2020) Frequent Homozygous Deletions of Type I Interferon Genes in Pleural Mesothelioma Confer Sensitivity to Oncolytic Measles Virus. *J Thorac Oncol* 15:827–842. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.12.128>
10. Galanis E, Atherton PJ, Maurer MJ, et al (2015) Oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter to treat drug-resistant ovarian cancer. *Cancer Research* 75:22–30. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2533>
11. Kurokawa C, Iankov ID, Anderson SK, et al (2018) Constitutive Interferon Pathway Activation in Tumors as an Efficacy Determinant Following Oncolytic Virotherapy. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 110:1123–1132. <https://doi.org/10.1093/jnci/djy033>
12. Blondy T, d’Almeida SM, Briolay T, et al (2020) Involvement of the M-CSF/IL-34/CSF-1R pathway in malignant pleural mesothelioma. *J Immunother Cancer* 8:e000182. <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000182>
13. Baker BM, Chen CS (2012) Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J Cell Sci* 125:3015–3024. <https://doi.org/10.1242/jcs.079509>
14. Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, et al (2015) 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol* 230:16–26. <https://doi.org/10.1002/jcp.24683>

15. Combredet C, Labrousse V, Mollet L, et al (2003) A Molecularly Cloned Schwarz Strain of Measles Virus Vaccine Induces Strong Immune Responses in Macaques and Transgenic Mice. *J Virol* 77:11546–11554. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.21.11546-11554.2003>
16. Kärber G (1931) Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Archiv f experiment Pathol u Pharmakol* 162:480–483. <https://doi.org/10.1007/BF01863914>
17. Anders S, Huber W (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology* 11:R106. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-10-r106>
18. Nath S, Devi GR (2016) Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol Ther* 163:94–108. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.013>
19. Grill J, Lamfers MLM, van Beusechem VW, et al (2002) The Organotypic Multicellular Spheroid Is a Relevant Three-Dimensional Model to Study Adenovirus Replication and Penetration in Human Tumors in Vitro. *Molecular Therapy* 6:609–614. <https://doi.org/10.1006/mthe.2002.0713>
20. Sridhar A, Simmini S, Ribeiro CMS, et al (2020) A Perspective on Organoids for Virology Research. *Viruses* 12:1341. <https://doi.org/10.3390/v12111341>
21. He B, Chen G, Zeng Y (2016) Three-dimensional cell culture models for investigating human viruses. *Virol Sin* 31:363–379. <https://doi.org/10.1007/s12250-016-3889-z>
22. Allagui F, Achard C, Panterne C, et al (2017) Modulation of the Type I Interferon Response Defines the Sensitivity of Human Melanoma Cells to Oncolytic Measles Virus. *Curr Gene Ther* 16:419–428. <https://doi.org/10.2174/1566523217666170102110502>
23. Thomlinson RH, Gray LH (1955) The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer* 9:539–549. <https://doi.org/10.1038/bjc.1955.55>
24. Li Petri G, El Hassouni B, Sciarrillo R, et al (2020) Impact of hypoxia on chemoresistance of mesothelioma mediated by the proton-coupled folate transporter, and preclinical activity of new anti-LDH-A compounds. *Br J Cancer* 123:644–656. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0912-9>
25. Rosen LE, Karrison T, Ananthanarayanan V, et al (2018) Nuclear grade and necrosis predict prognosis in malignant epithelioid pleural mesothelioma: a multi-institutional study. *Mod Pathol* 31:598–606. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.170>
26. Karsch-Bluman A, Benny O (2020) Necrosis in the Tumor Microenvironment and Its Role in Cancer Recurrence. *Adv Exp Med Biol* 1225:89–98. https://doi.org/10.1007/978-3-030-35727-6_6
27. Vogl M, Rosenmayr A, Bohanes T, et al (2021) Biomarkers for Malignant Pleural Mesothelioma-A Novel View on Inflammation. *Cancers (Basel)* 13:658. <https://doi.org/10.3390/cancers13040658>
28. Mack M (2018) Inflammation and fibrosis. *Matrix Biol* 68–69:106–121. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.11.010>
29. Darby IA, Hewitson TD (2016) Hypoxia in tissue repair and fibrosis. *Cell Tissue Res* 365:553–562. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2461-3>

30. Distler JHW, Jünger A, Pilecky M, et al (2007) Hypoxia-induced increase in the production of extracellular matrix proteins in systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatism* 56:4203–4215. <https://doi.org/10.1002/art.23074>
31. Klominek J, Robért KH, Sundqvist KG (1993) Chemotaxis and haptotaxis of human malignant mesothelioma cells: effects of fibronectin, laminin, type IV collagen, and an autocrine motility factor-like substance. *Cancer Res* 53:4376–4382
32. Ferriola PC, Stewart W (1996) Fibronectin expression and organization in mesothelial and mesothelioma cells. *Am J Physiol* 271:L804–812. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1996.271.5.L804>
33. Emri S, Ustündağ Y, Budak T, et al (1997) Assessment of the value of fibronectin as a tumour marker in malignant pleural mesothelioma. *Monaldi Arch Chest Dis* 52:335–338
34. Siri A, Carnemolla B, Raffanti S, et al (1984) Fibronectin concentrations in pleural effusions of patients with malignant and non-malignant diseases. *Cancer Lett* 22:1–9. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(84\)90037-5](https://doi.org/10.1016/0304-3835(84)90037-5)
35. Toth K, Wold WSM (2010) Increasing the Efficacy of Oncolytic Adenovirus Vectors. *Viruses* 2:1844–1866. <https://doi.org/10.3390/v2091844>
36. Vähä-Koskela MJV, Kallio JP, Jansson LC, et al (2006) Oncolytic capacity of attenuated replicative semliki forest virus in human melanoma xenografts in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res* 66:7185–7194. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2214>
37. Yaacov B, Lazar I, Tayeb S, et al (2012) Extracellular matrix constituents interfere with Newcastle disease virus spread in solid tissue and diminish its potential oncolytic activity. *J Gen Virol* 93:1664–1672. <https://doi.org/10.1099/vir.0.043281-0>
38. Fang JY, Tan S-J, Wu Y-C, et al (2016) From competency to dormancy: a 3D model to study cancer cells and drug responsiveness. *Journal of Translational Medicine* 14:38. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0798-8>
39. Barney LE, Hall CL, Schwartz AD, et al (2020) Tumor cell–organized fibronectin maintenance of a dormant breast cancer population. *Sci Adv* 6:eaaz4157. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz4157>
40. Tong JG, Valdes YR, Barrett JW, et al (2015) Evidence for differential viral oncolytic efficacy in an in vitro model of epithelial ovarian cancer metastasis. *Mol Ther Oncolytics* 2:15013. <https://doi.org/10.1038/mto.2015.13>
41. Pranzini E, Raugei G, Taddei ML (2022) Metabolic Features of Tumor Dormancy: Possible Therapeutic Strategies. *Cancers (Basel)* 14:547. <https://doi.org/10.3390/cancers14030547>
42. Thaker SK, Ch'ng J, Christofk HR (2019) Viral hijacking of cellular metabolism. *BMC Biology* 17:59. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0678-9>
43. Ogino T, Iwama M, Kinouchi J, et al (1999) Involvement of a Cellular Glycolytic Enzyme, Phosphoglycerate Kinase, in Sendai Virus Transcription*. *Journal of Biological Chemistry* 274:35999–36008. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.50.35999>
44. Romano N, Scarlata G (1973) Amino acids requirements of measles virus in hela cells. *Archiv f Virusforschung* 43:359–366. <https://doi.org/10.1007/BF01556153>

Table 1: MPM cell lines characteristics: E: epithelioid, S: sarcomatoid, HD: homozygous deletion, LOH: loss of heterozygosity, M: mutation.

MPM cell lines	Type	CDKN2A	IFN I genes	BAP1	NF2	LATS2	TP53	MV replication in 2D culture
Meso4	E	HD	LOH	M				Resistant
Meso11	E	HD	HD		M			Permissive
Meso13	E	HD	HD					Permissive
Meso31	S	HD	HD					Permissive
Meso34	E	HD		M	M	M		Permissive
Meso61	E	LOH		M	M			Resistant
Meso173	E	HD	LOH		M			Resistant
Meso225	E	HD	HD	M			M	Permissive

Figures Legends

Figure 1. MPM spheroids are poorly permissive to MV replication in an independent manner of the IFN I response. 30,000 cells of each cell line, resistant (R) or permissive (P) to MV replication in 2D, were cultured in 2D or 3D for 3 days with Ruxolitinib (2 μ M) or not and then infected with MV or MV GFP (MOI 1). **A** - GFP expression was monitored over 10 days by Fluoroscan. The fluorescence value correspond to the ratio between the fluorescence of infected cells and the fluorescence of non-infected cells. Statistic comparisons : between 3D ruxo and 2D Ruxo, n=6 minimum. **B** - MV in supernatant was titrated 3 days after infection by TCID50 method on Vero cells. Statistic analyses for the cell lines cultured in 3D were relative to the same cell lines in 2D, n=3 minimum. **C** - Cell viability was measured 6 days after MV infection. The value correspond to the ratio between infected and non-infected cells. Statistic analyses for the cell lines cultured in 3D were relative to the same cell lines in 2D, n=3 minimum. **D** - Cells were fixed (4% paraformaldehyde) 3 days after MV GFP infection. Spheroids were then permeabilized (Triton 2%) and the nucleus was labeled (Hoescht). Spheroids were transparized with Rapisclear 1.52. 2D cells and spheroids were imaged by confocal microscopy, x25 objective. **E** - 30,000 cells of Meso13 MPM cell line were cultured in 3D with Ruxolitinib (2 μ M) and infected with MV GFP (MOI 1) at day 0, day 1, day 2 and day 3. Pictures of GFP fluorescence were taken 3 days after the infection. Statistic analyses : Wilcoxon rank sum test. Pvalue < 0.05 = * ; < 0.005 = ** ; < 0.0005 = *** ; < 0.00005 = ****.

Figure 2. Resistance of MPM spheroids to MV is not due to decreased expression of viral receptors. 30,000 cells of each cell line were cultured in 2D or 3D for 3 days **A** - Cells are then resuspended and labeled with anti-CD46, CD150 and Nectin-4 fluorescent antibodies. Fluorescence was analysed by flow cytometry. RMFI is shown on histogram. n=1 to n=3. **B** - Cells were fixed (4% paraformaldehyde) and then permeabilized (Triton 2%). The nucleus (Hoescht in blue) and CD46 (red) were labeled. Spheroids were transparized with Rapisclear 1.52. Spheroids were imaged by confocal microscopy, x25 objective.

Figure 3. Transcriptomic analysis of MPM spheroids shows an ECM fibrosis associated with an inflammatory environment, a significant cell cycle slowing and no response to MV infection in MV-resistant cell lines. 30,000 cells of each cell line were cultured in 2D or 3D for 3 days. n=6 to n=8. Transcriptomic analysis using the 3'seq-RNA Profiling (3'SRP) method was then performed on the samples. **A** - Significantly deregulated genes before an infection with MV (MOI 1) in 2D and 3D. **B** - Significantly deregulated genes in 3D. **C** - Significantly dysregulated signalling pathways (KEGG) in 3D. **D** - GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) in 3D.

Figure 4: Expression of genes from cell cycle, extra cellular matrix (ECM) and Inflammation pathways is deregulated in MPM cell lines cultured under 3D conditions. 30,000 cells of each cell line were cultured in 2D or 3D conditions for 3 days. Transcriptomic analysis by 3'seq-RNA profiling (3'SRP) was then performed on the samples. Differential expression of genes associated with cell cycle (**A**), inflammation (IL-17/NF-kB/TNF pathway)(**B**) and extracellular matrix (ECM)(**C**) pathways (KEGG) in MPM cell lines cultured under 3D conditions compared to 2D conditions are shown.

Figure 5. Spheroidal culture of MPM cell lines induces a dormancy state. 30,000 cells of each cell line were cultured in 2D or 3D for 3 days. **A/B** - Cell cycle phases was analyzed by Two-step Nucleocounter after DAPI staining. Statistic analyses of cell lines cultured in 3D concerned the G2/M step et were relative to the G2/M step of the same cell lines cultured in 2D, n=1 to n=5. Statistic analyses : Wilcoxon rank sum test. Pvalue < 0.05 = *. **C** - Meso13 spheroids were fixed (4% paraformaldehyde) and then permeabilized (Triton 2%). The nucleus (Hoescht in blue) and Ki67 (green) were labeled. Spheroids were transparized with Rapisclear 1.52. Spheroids were imaged by confocal microscopy, x25 objective.

Figure 6. Modulation of cellular activity and cell cycle affects MV replication capacity. Meso13 cells were cultured in 3D with or without EGF (10ng/ml) or cultured in 2D during 24 hours with serum (NT) or without serum (- serum) ; some cells cultured without serum were then pulsed with a medium with serum during 24 hours (pulsed serum). **A** - Cell cycle phases was analyzed by Two-step Nucleocounter after DAPI staining. Statistic analyses of cell lines cultured in 3D concerned the G2/M step et were relative to the NT condition, n=1 to n=6. **B** - Spheroids were fixed (4% paraformaldehyde) and then permeabilized (Triton 2%). The nucleus (Hoescht in blue) and Ki67 (green) were labeled. Spheroids were transparized with Rapiclear 1.52. Spheroids were imaged by confocal microscopy, x25 objective. **C** – Cells were infected by MV GFP MOI 1 for 3 days. The green fluorescence of GFP was analysed by flow cytometry. RMFI is shown on histogram. Statistic analyses of cell lines cultured in 3D concerned the G2/M step et were relative to the NT condition, n=2 to n=4. **D** - Cells were fixed (4% paraformaldehyde) 3 days after MV GFP infection. Spheroids were then permeabilized (Triton 2%) and the nucleus was labeled (Hoescht). Spheroids were transparized with Rapiclear 1.52. Spheroids were imaged by confocal microscopy, x25 objective. Statistic analyses : Wilcoxon rank sum test. Pvalue < 0.05 = *.

Supplemental figure 1. TCID50 at J+6. 30,000 cells of each cell line were cultured in 3D for 3 days with Ruxolitinib (2 μ M) and then infected with MV GFP (MOI 1). MV in supernatant was titrated 6 days after infection by TCID50 method on Vero cells.

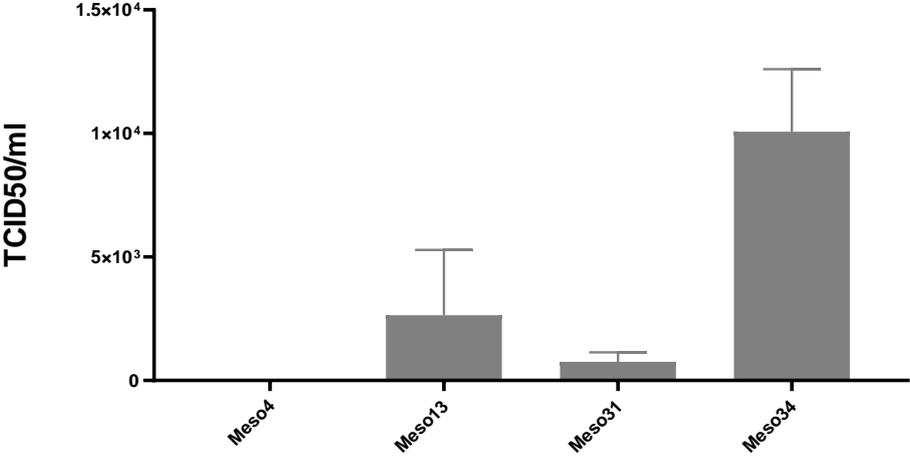
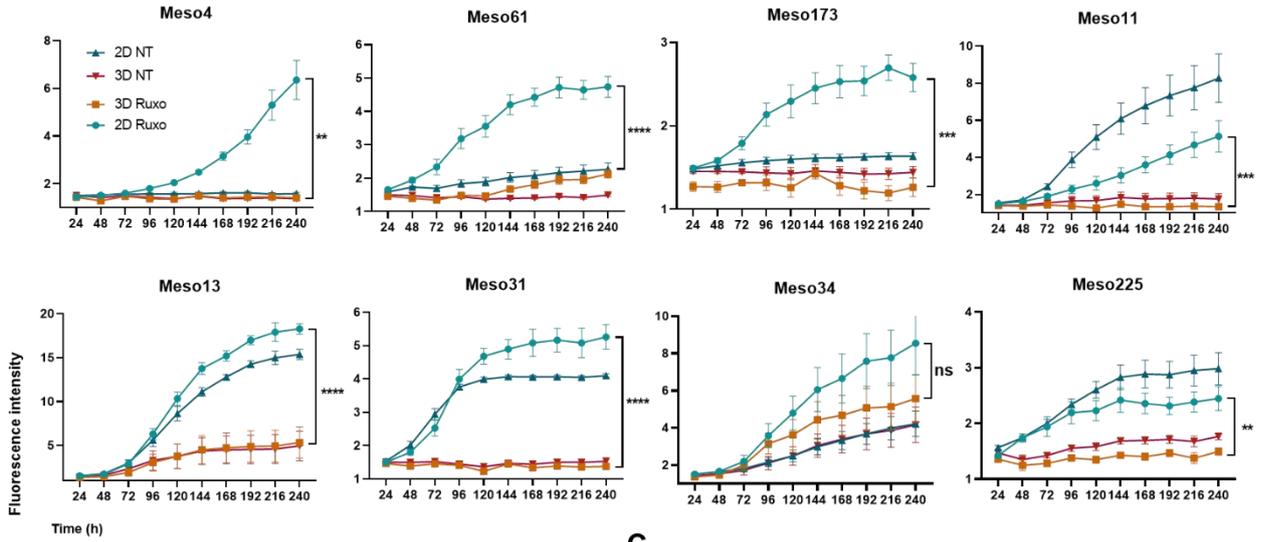
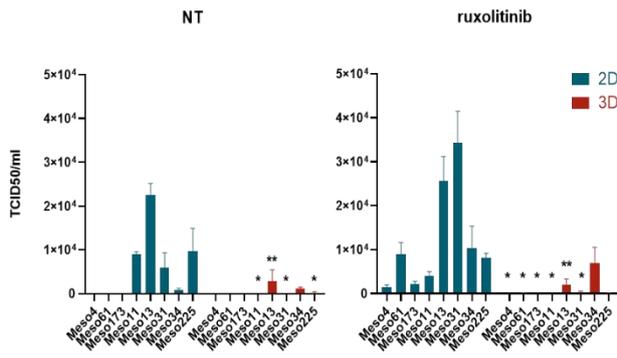


Figure 1.

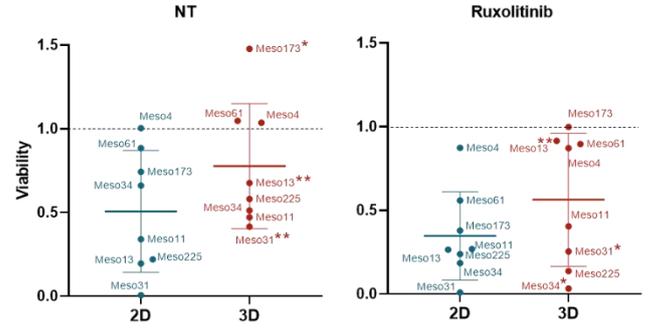
A



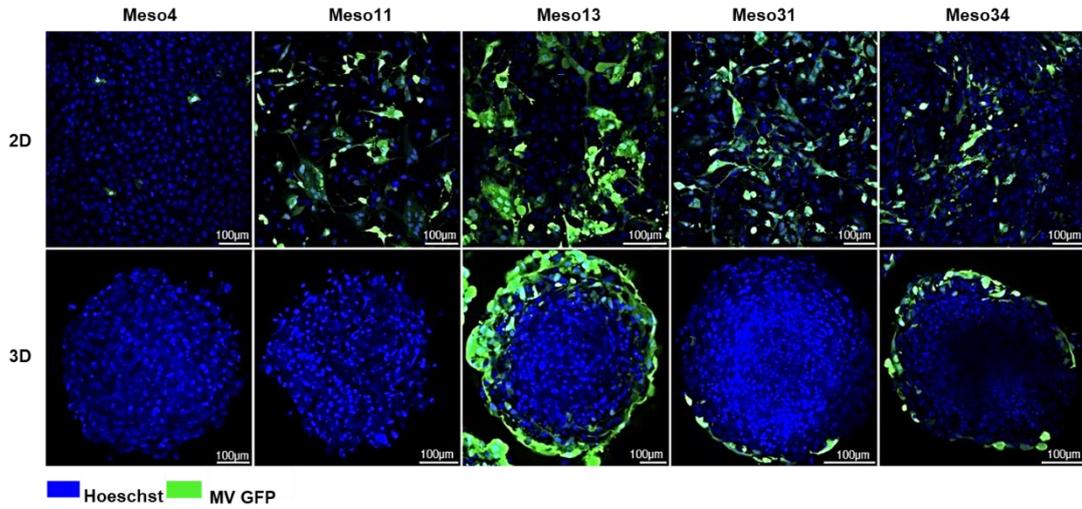
B



C



D



E

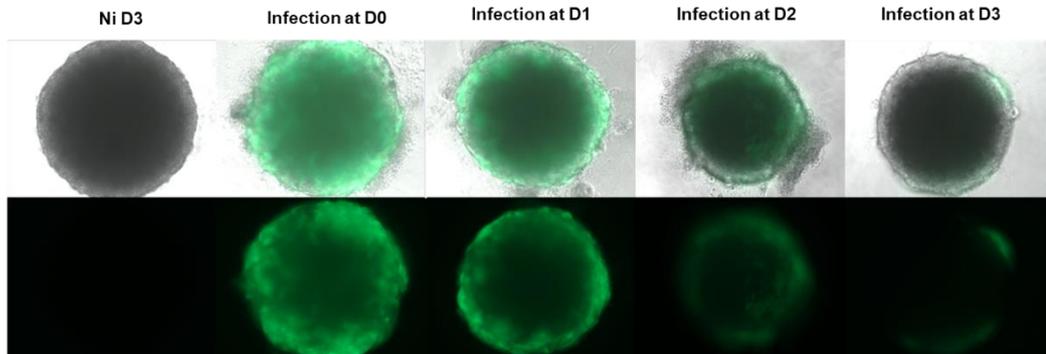
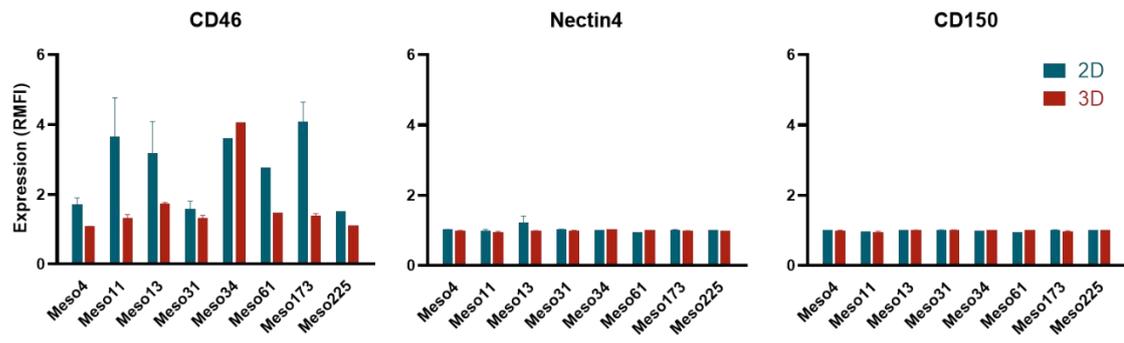


Figure 2.

A



B

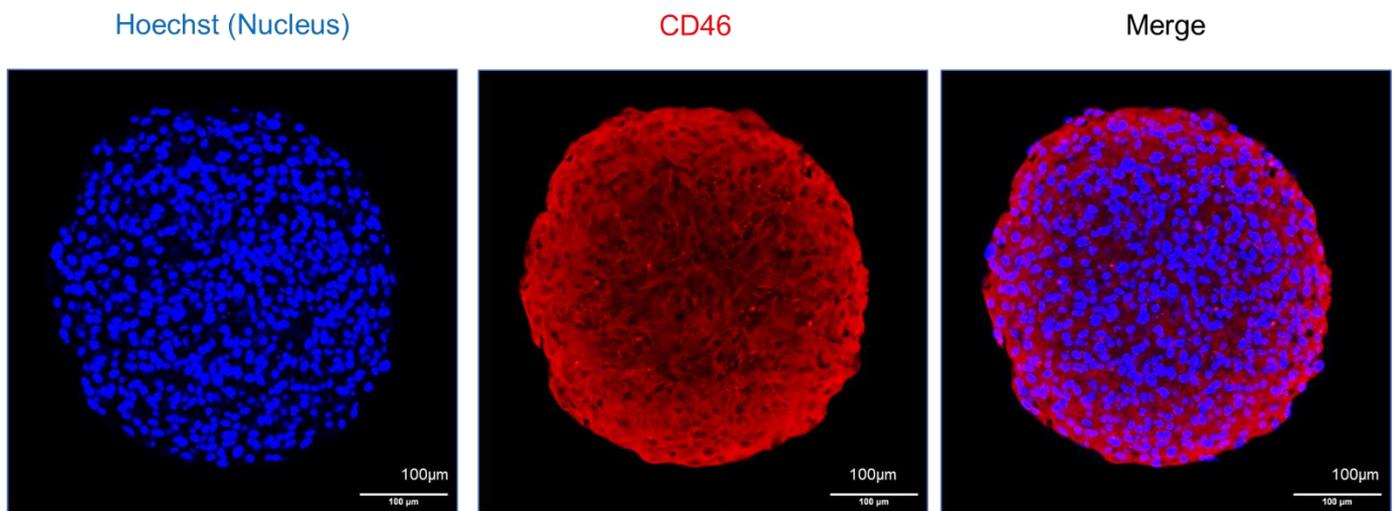


Figure 3.

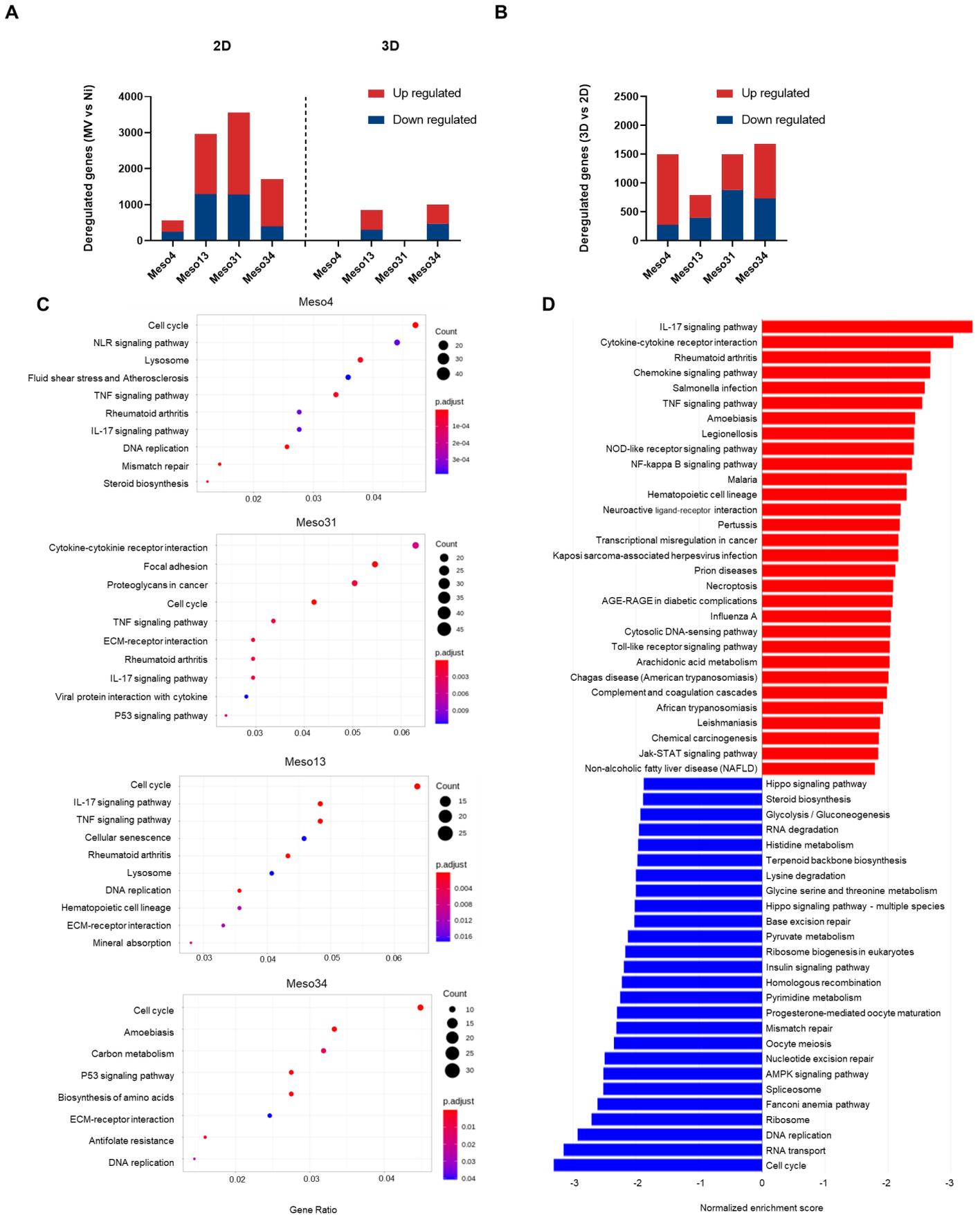


Figure 4.

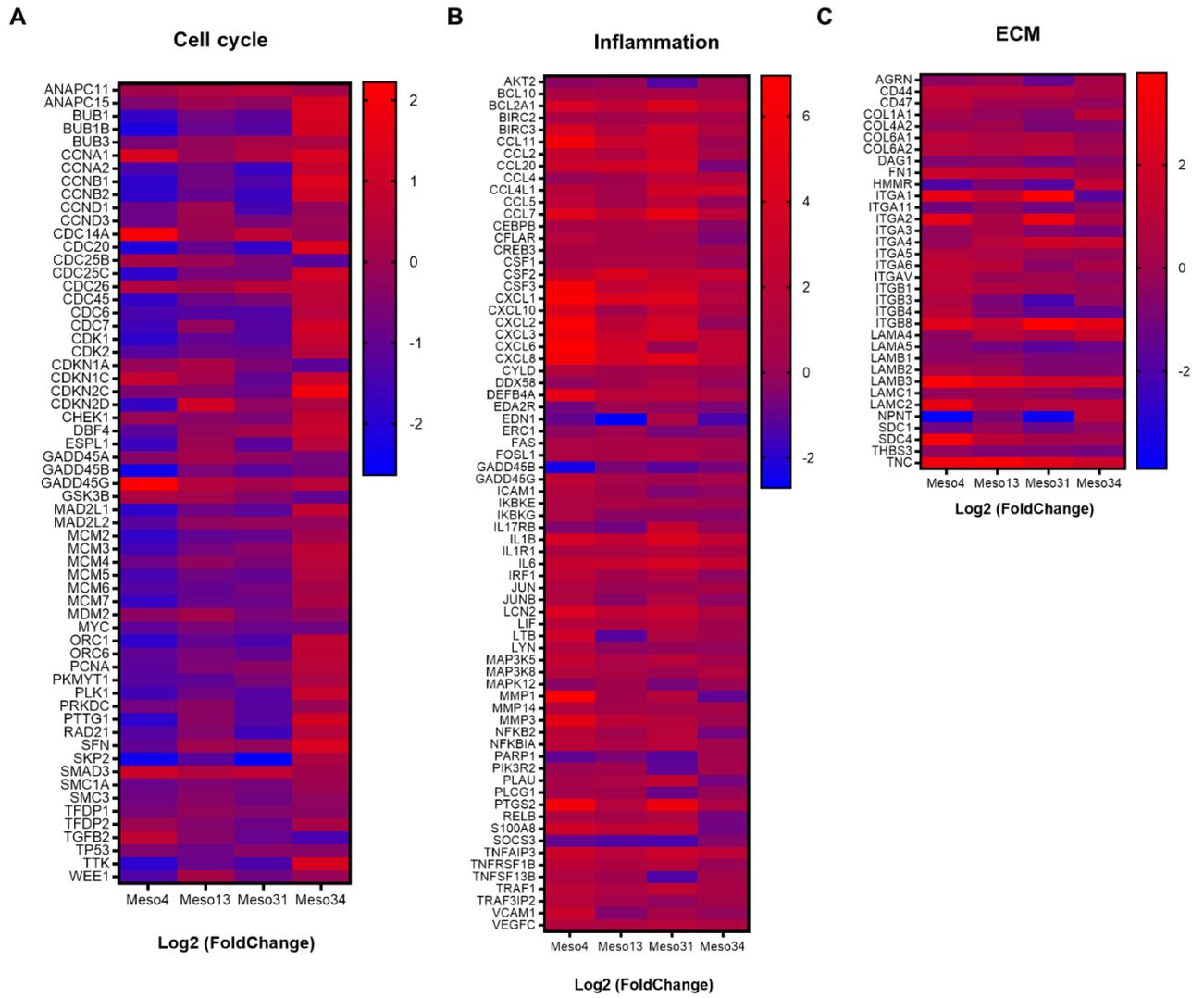


Figure 5.

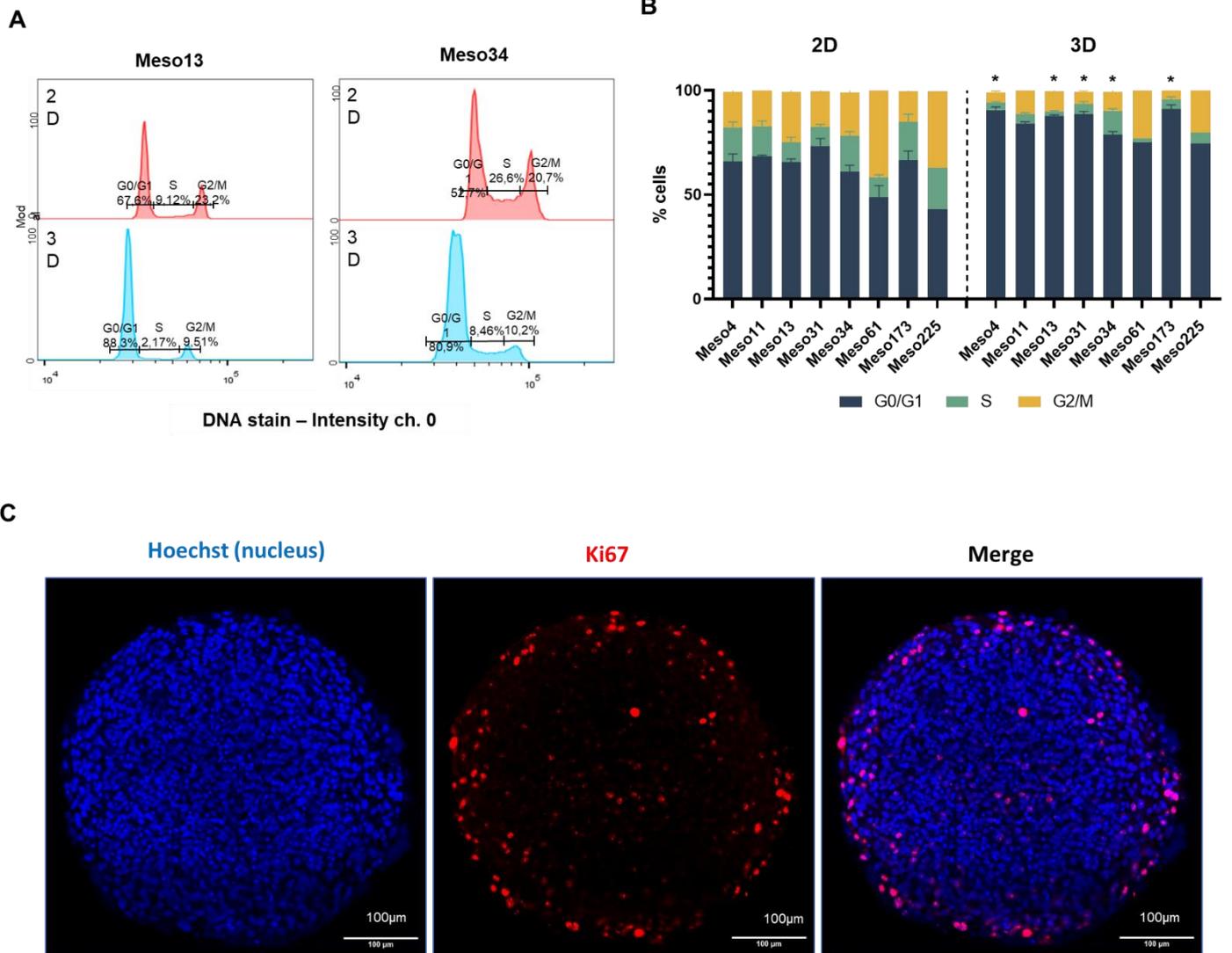
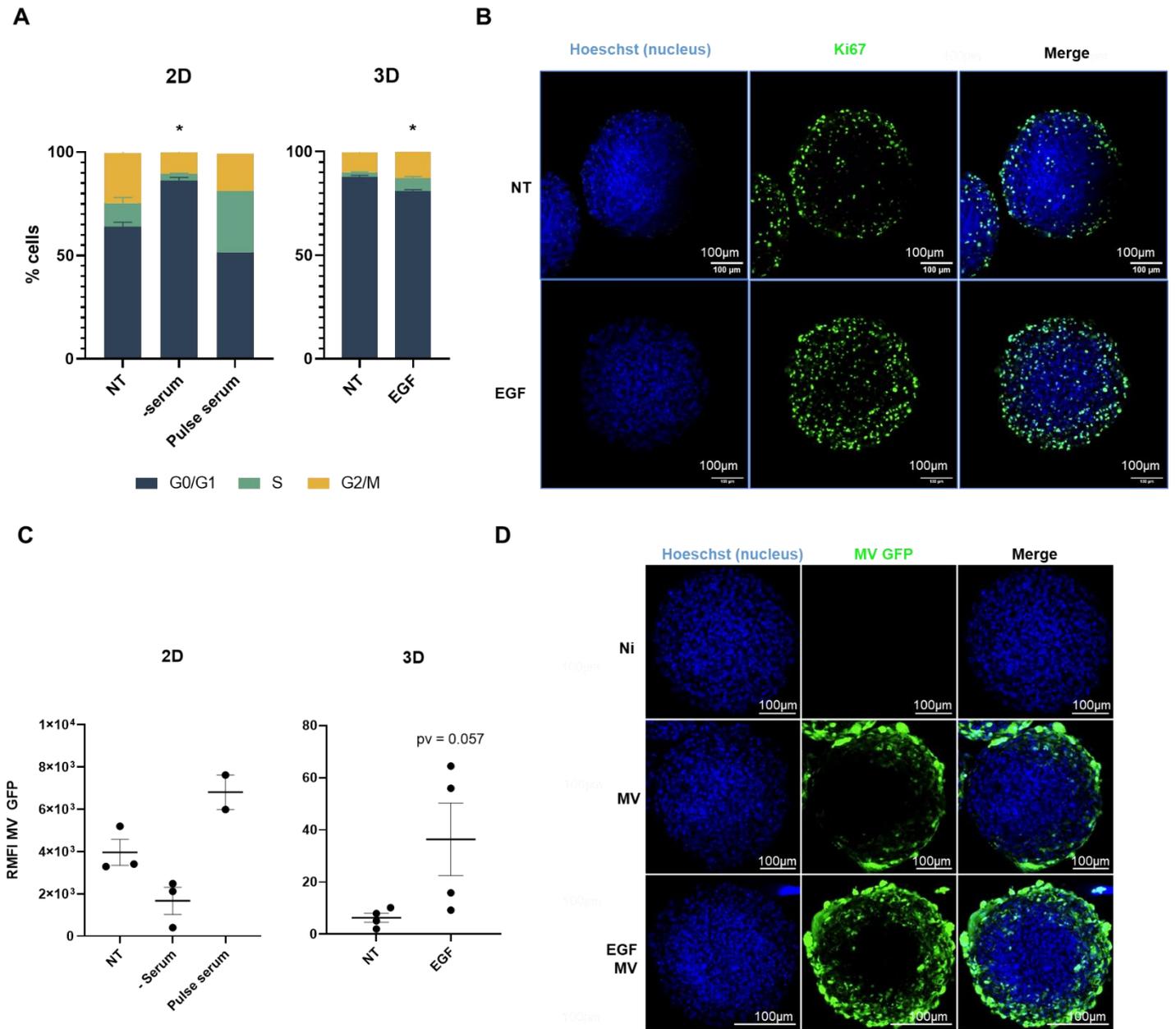


Figure 6.



2. Résultats complémentaires

A. Introduction

L'étude des facteurs de restriction du MV dans les sphéroïdes de MPM a révélé la dérégulation de nombreux mécanismes cellulaires dans ces modèles 3D par rapport aux modèles en 2D. Parmi eux, nous avons montré que l'altération de la prolifération cellulaire semble responsable d'une forte diminution de la réplication du MV oncolytique. Néanmoins, l'analyse comparative des séquençages en 2D et 3D a également mis en évidence une dérégulation significative de l'expression de certains gènes codant pour des protéines de la matrice extracellulaire comme *COL1A1*, *COL4A2*, *COL6A1*, *COL6A2*, *FN1* et *TNC*. Les protéines de la matrice extracellulaire jouent un rôle crucial dans la capacité des OV_s à infecter les cellules tumorales⁴⁴⁴. En effet, les réseaux complexes formés par ces protéines possèdent une forte capacité de rétention des particules virales, formant de véritables barrières à la propagation virale⁴⁴⁵. En analysant la composition et la structure de la matrice extracellulaire de nos modèles de sphéroïdes par microscopie confocale, je propose une piste supplémentaire permettant d'expliquer les mécanismes impliqués dans leur résistance au MV oncolytique. Ces résultats complémentaires seront discutés conjointement aux principaux travaux de thèse lors du dernier chapitre de ce manuscrit.

B. Méthode

Des sphéroïdes tumoraux de la lignée cellulaire de MPM Meso13 ont été formés comme décrit précédemment. Après 3 jours, ils ont été fixés avec du PBS 4% de paraformaldéhyde (Electron Microscopy Sciences) pendant 30 minutes. Après lavage, ils ont été perméabilisés dans du PBS Triton 2% (Merk) pendant 24 heures.

Pour la microscopie confocale classique les noyaux des cellules ont été marquées avec 5µg/ml de Hoeschst 33342 (Sigma), avec un anticorps anti-fibronectine-1 (FN1) (Sigma F3648) au 200^{ème}, ou anti-ténascine-C (TNC) (Sigma T2551) au 200^{ème} dans du PBS 0,1% Bovine Serum Albumine (BSA) (Sigma) et 0,2% Triton (Merk) pendant 24 heures. Après 24 heures de lavage, les sphéroïdes ont été marqués avec des anticorps secondaires anti-lapin 647 (Life A21245) et anti-souris 488 (Invitrogen A11029) pendant 24 heures. Les sphéroïdes ont ensuite été

transparisés avec du Rapiclear 1.52 (SUNJIN lab) et ont été imagés avec un microscope confocal Nikon A1rHD LFOV, objectif x25. Le traitement et l'analyse des images ont été effectués avec le logiciel ImageJ.

Pour la microscopie par génération de seconde harmonique (SHG : Second Harmonic Generation), les sphéroïdes ont été transparisés avec du Rapiclear 1.52 (SUNJIN lab) directement après fixation et ont été imagés avec un microscope biphotonique Nikon A1RMP couplé au laser accordable Insight Deepsee 680-1300 nm. Le signal du collagène a été analysé selon le protocole précédemment décrit⁴⁴⁶, sans polarisation, objectif x16.

C. Résultats

L'analyse transcriptomique a révélé une modification de la composition de la matrice extracellulaire lorsque les cellules de MPM sont cultivées en sphéroïdes. La présence d'une matrice extracellulaire dense pouvant entraver la pénétration des particules virales dans un tissu, nous avons effectué une analyse spatiale des principales protéines de la matrice extracellulaire qui se sont révélées être régulées à la hausse dans les transcriptomes 3D.

Tout d'abord, la localisation et la structure des fibres de ténascine-C (TNC) et de fibronectine-1 (FN1) ont été révélées par marquage immunofluorescent par microscopie confocale sur des sphéroïdes de la lignée de MPM Meso13 (Figure 1A). Les résultats de ces analyses révèlent tout d'abord la mise en place d'un réseau dense et homogène FN1 dans l'ensemble du sphéroïde. La TNC quant à elle semble former un réseau plus lâche, essentiellement en périphérie du sphéroïde et dans les couches intermédiaires.

Ensuite, nous avons révélé la structure du réseau de collagène dans les sphéroïdes en utilisant la technique de génération de seconde harmonique (SHG : *second harmonic generation*) en microscopie confocale biphotonique (Figure 1B). Cette technique permet de mettre en évidence des structures non centrosymétriques telles que les fibres de collagène. Le signal a été obtenu dans le sens avant et retour, ce qui indique qu'il s'agit bien d'un signal de SHG. Ce signal a mis en évidence la présence de fibres de collagène denses uniquement au cœur du sphéroïde.

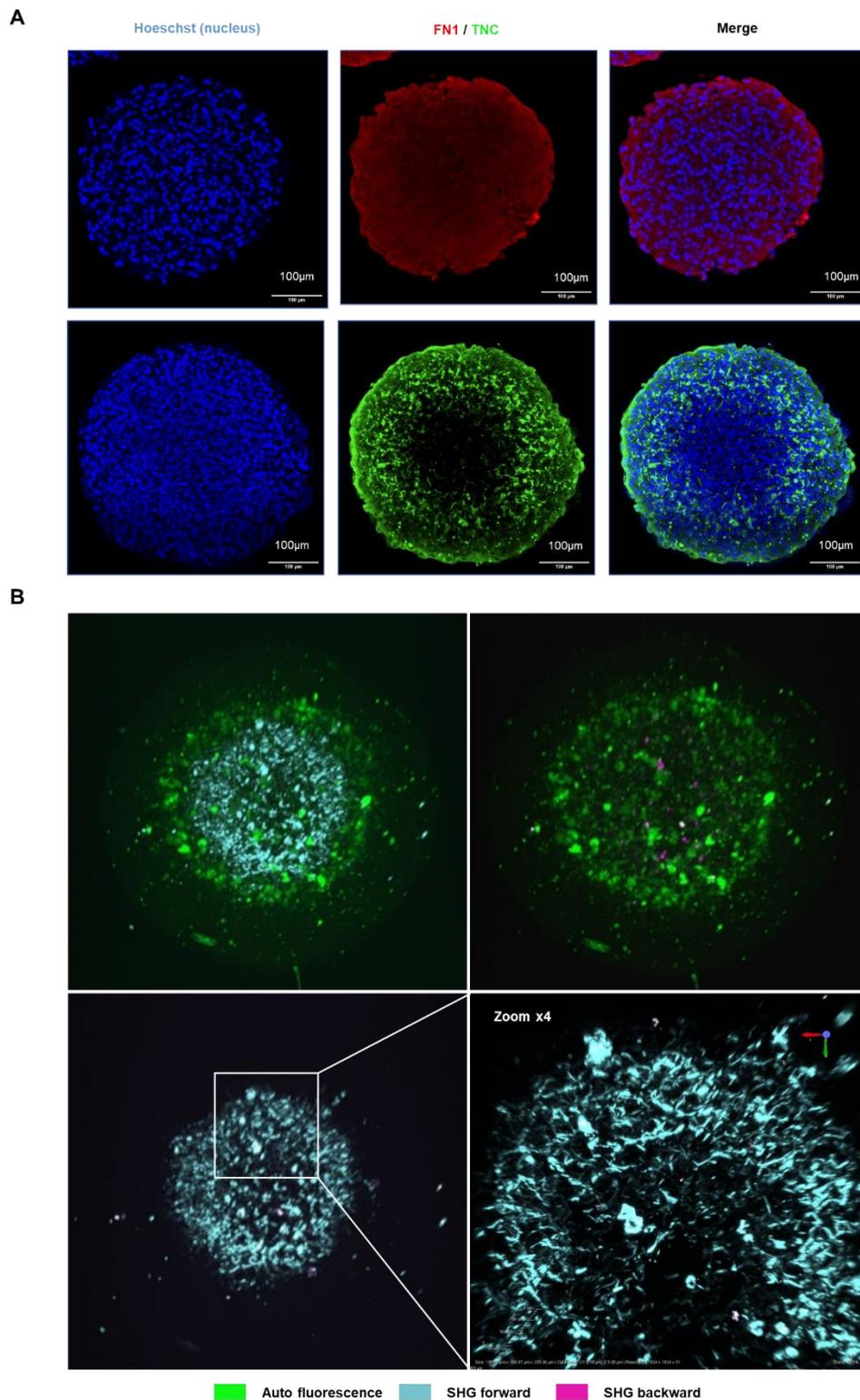


Figure 1 : Expression et localisation des fibres matricielles des sphéroïdes de Meso13. 30 000 cellules de la lignée de MPM Meso13 ont été cultivées en 3D pendant 3 jours avant d'être fixées **(A)** Les noyaux (Hoeschst), la Fibronectine 1 (FN1) et la Ténascine C (TNC) ont ensuite été marqués. Les sphéroïdes ont été transparisés puis imagés par microscopie confocale, objectif x25. **(B)** Les sphéroïdes ont été perméabilisés, transparisés et le signal du collagène a été analysé par SHG, objectif X16, sans polarisation.

3. Oncolytic attenuated measles virus encoding NY-ESO-1 induces HLA I and II presentation of this tumor antigen by melanoma and dendritic cells

Les résultats sont présentés ici sous la forme d'un article scientifique en cours de révision dans le journal *Cancer immunology and immunotherapy*.

Oncolytic attenuated measles virus encoding NY-ESO-1 induces HLA I and II presentation of this tumor antigen by melanoma and dendritic cells.

Marion Grard^{1,2*}, Mohamed Idjellidaine^{1,2*}, Atousa Arbabian³, Camille Chatelain^{1,2}, Chantal Combredet³, Soizic Dutoit^{1,2}, Sophie Deshayes^{1,2}, Virginie Dehame^{1,2}, Nathalie Labarrière^{2,4}, Delphine Fradin^{1,2}, Nicolas Boisgerault^{1,2}, Christophe Blanquart^{1,2}, Frédéric Tangy³ and Jean-François Fonteneau^{1,2}.

¹ Nantes Université, Inserm, CNRS, Université d'Angers, CRCI2NA, Nantes - France

² Labex IGO, Immunology Graft Oncology, Nantes, France

³ CNRS 3569, Institut Pasteur, Paris, 75015, France.

⁴ Nantes Université, Université d'Angers, Inserm, Immunology and New Concepts in ImmunoTherapy, INCIT, UMR 1302, F-44000 Nantes, France

Corresponding author: Jean-François FONTENEAU, CRCIN2A, INSERM UMR1307, CNRS UMR6075, Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes, 8 quai Moncoussu, BP 70721, 44007 Nantes cedex 1

Email: jean-francois.fonteneau@inserm.fr

Short Title: Measles virus encoding NY-ESO-1

* MG and MI equally contributed to this work.

Abstract

Antitumor virotherapy stimulates the antitumor immune response during tumor cell lysis induced by oncolytic viruses (OV). OV can be modified to express additional transgenes that enhance their therapeutic potential. In this study, we armed the spontaneously oncolytic Schwarz strain of measles viruses (MV) with the gene encoding the cancer/testis antigen NY-ESO-1 to obtain MVny. We compared MV and MVny oncolytic activity and ability to induce NY-ESO-1 expression in six human melanoma cell lines. After MVny infection, we measured the capacity of melanoma cells to present NY-ESO-1 peptides to CD4⁺ and CD8⁺ T cell clones specific for this antigen. We assessed the ability of MVny to induce NY-ESO-1 expression and presentation in monocyte-derived dendritic cells (DC). Our results show that MVny and MV oncolytic activity are similar with a faster cell lysis induced by MVny. We also observed that melanoma cell lines and DC expressed the NY-ESO-1 protein after MVny infection. In addition, MVny-infected melanoma cells and DC were able to stimulate NY-ESO-1 specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Finally, MVny was able to induce DC maturation. Altogether, these results show that MVny could be an interesting candidate to stimulate NY-ESO-1 specific T cells in melanoma patients with NY-ESO-1-expressing tumor cells.

Keywords

antitumor immunotherapy, measles virus, melanoma, tumor antigen, NY-ESO-1, T cells.

Introduction

Antitumor virotherapy consists in using oncolytic viruses (OV) to treat cancer. OV are non-pathogenic replicative viruses that infect, replicate in and kill tumor cells without harming healthy cells [1]. Furthermore, infection of tumor cells by OV should result in immunogenic cell death that potentially stimulate antitumor immune responses [2]. The combination of danger signals, tumor-associated antigens (TAA) and pro-inflammatory cytokines released by infected and dying tumor cells activates antigen-presenting cells such as dendritic cells (DC) that become able to initiate anti-tumor T cell responses [3, 4].

Numerous TAA that are recognized by T cells via HLA molecules on the surface of tumor cells have been identified [5]. They are classified as mutated, tumor-specific, differentiation or overexpressed antigens. Tumor-specific TAA, also known as cancer/testis or cancer-germline antigens share interesting properties for cancer immunotherapy with mutated neo-antigens. Their expression is restricted to tumor cells and they are recognized by a specific T cell repertoire of high avidity [6]. In addition, their expression is shared by a variety of tumors. New York esophageal squamous cell carcinoma 1 antigen (NY-ESO-1) that is encoded by the gene *CTAG1B* is a tumor-specific TAA that is expressed in several types of cancers such as melanoma or lung adenocarcinoma. This TAA is a good candidate for immunotherapy since it can be spontaneously recognized in patients not only by cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes, but also by CD4⁺ T cells and B lymphocytes [7–9]. Several immunotherapy clinical trials using NY-ESO-1 as a target are undergoing [10].

Measles virus (MV) is an enveloped, negative sense ssRNA paramyxovirus responsible for Measles. The attenuated Schwarz strain of MV is commonly used for children vaccination. This strain displays spontaneous oncolytic activity against numerous types of cancers, notably melanoma [11], lung and colon adenocarcinoma [12] and malignant pleural mesothelioma [13, 14]. Other attenuated MV strains such as the Edmonston strain are evaluated in clinical trials

for the treatment of ovarian cancer, glioblastoma multiforme, multiple myeloma, mesothelioma, head and neck, breast cancers and malignant peripheral nerve sheath tumors [15]. Despite a relatively small genome of around 16,000 nucleotides, MV can accept additional transgenes for use in antitumor virotherapy [16–18] or prophylactic vaccination [19, 20]. Concept of TAA encoding OV for tumor vaccination was introduced using Maraba virus encoding a melanoma antigen [21], and has been applied also to MV [22].

In this study, we generated MVny by insertion of the gene encoding NY-ESO-1 into the Schwarz MV genome. We then evaluated MVny oncolytic activity against human melanoma cell lines and observed that it was preserved compared to standard Schwarz MV. MVny induced a strong NY-ESO-1 expression in infected melanoma cell lines and a moderate expression in human monocyte-derived DC. Finally, we demonstrated in vitro that melanoma cell lines or DC exposed to MVny present efficiently NY-ESO-1 peptides to NY-ESO-1-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cell clones. Altogether, our results suggest that MVny might be an interesting OV to induce NY-ESO-1 presentation to T cells.

Material and methods

Tumor cells lines

The M18, M45, M88, M117 and M199 human melanoma cell lines were provided by Dr Nathalie Labarrière (INCIT, Nantes) that are part of the PC-U892-NL Biocollection (CHU Nantes, France). Samples were collected in accordance with the standards established by the Declaration of Helsinki. All recruited patients gave signed informed consent. Study was approved by local ethical committee (CPP Ouest-IV -Nantes). The IPC277/5 was provided by Dr C. Auben (INSERM, Marseille). The cell lines were maintained at 37°C, under 100% humidity and 5% CO₂ in Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640 (Gibco, France) supplemented with 100U/mL Penicillin (Gibco, France), 100µg/mL Streptomycin (Gibco, France), 2mM L-Glutamine (Gibco, France), and 10% Fetal Calf Serum (FCS, Eurobio) previously decontaminated. Cells were routinely checked for Mycoplasma contamination using the Plasmotest from InvivoGen.

Human NY-ESO-1-specific T cell clones

NY67, a CD4⁺ T cell clone specific for the HLA-DPb*0401/NY-ESO-1(157-170) complex, and N5.14, a CD8⁺ T cell clone specific for the HLA-A*0201/Mucin-1(950-958) complex were obtained from blood donors as previously described [23, 24]. M.117.167, a CD8⁺ T cell clone specific for the HLA A*0201/NY-ESO-1(157-165) complex was obtained from tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) from a melanoma patient biopsy [25]. The clones were seeded for amplification at 5,000 cells/well in 150µL of RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 100U/mL Penicillin (Gibco), 100µg/mL Streptomycin (Gibco), 2mM L-Glutamine (Gibco), 8% pooled human serum and containing 1µg/mL of Leucoagglutinin PHA-L (Sigma, cat #L2769450), 150 UI/mL IL-2 (Proleukin, CHIRON) and irradiated feeder cells in 96-well round bottom plates. The feeder cells consisted of a B lymphocyte cell line immortalized by the

Epstein Barr virus and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) irradiated at 70 and 35 Gy and seeded at 1.10^4 and 1.10^5 cells per well, respectively. NY-ESO-1(157-165), SLLMWITQC, and NY-ESO-1(157-170), SLLMWITQCFLPVF, peptides were purchased from Eurogentech.

Human monocyte-derived DC

Blood monocytes were obtained by negative magnetic sorting (EasySep Human monocyte Enrichment Kit, StemCell) from PBMC of healthy donors provided by EFS (Etablissement Français du Sang, Nantes) as previously described [26]. Immature DCs were differentiated for 5 days from monocytes, seeded at 2.10^6 cells/mL in a 6-well plate with culture medium composed of RPMI 1640 (Gibco, France) supplemented with 100U/mL Penicillin (Gibco), 100 μ g/mL Streptomycin (Gibco, France), 2mM L-Glutamine (Gibco), 2% human albumin (Human Albumin 200 mg/mL, VIALEBEX), 1000IU/mL of GM-CSF (CellGenix) and 200IU/mL of Interleukin-4 (CellGenix). After 5 days immature DCs were collected for experiments.

Attenuated Schwarz MV, MVeGFP and MVny

Live-attenuated Schwarz-strain measles virus vaccine (MV), MV recombinant for the enhanced green fluorescent protein (MVeGFP), and MV recombinant for NY-ESO-1 (MVny) were produced and purified as previously described [27]. To generate MVny recombinant virus, the cDNA sequence of human NY-ESO-1 ORF (*CTAG1B*, clone NM 001327) was codon optimized for MV expression, modified at the stop codon to ensure that the total number of nucleotides is a multiple of six [19], and subsequently cloned into an additional transcription unit localized between the P and M genes in the pTM-MV Schw plasmid encoding infectious MV Schw cDNA corresponding to the antigenome of the MV Schwarz vaccine strain [27]. Rescue of recombinant virus was performed as previously described using a helper-cell-based

system [27]. Briefly, helper HEK293T cells expressing both the T7-RNA polymerase and the Schwarz MV N and P proteins (HEK293-T7-MV) were co-transfected with pTM-MV Schw-NY-ESO-1 vector plasmid and a plasmid expressing the Schwarz MV polymerase L. Transfected HEK293-T7-MV helper cells were gently harvested and co-cultured with Vero cells for amplification of MV Schw-NY-ESO-1 virus. Virus titers were determined by endpoint titration on Vero cells and expressed as TCID₅₀/ml. Replication of MV Schw-NY-ESO-1 recombinant virus was analyzed by single-step growth curves on Vero cells using an MOI of 0.1. The growth rate of recombinant MV Schw-NY-ESO-1 virus was similar to empty MV Schw.

Western blot assay

Vero Cells, Tumor cell lines or monocyte-derived DC were seeded at 5.10^5 cells/mL and infected with MV or MVny at a multiplicity of infection (MOI) of 1 in a 24-well plate in their respective media. After 48 hours of infection, cells were lysed in $100\mu\text{L}/1.10^6$ cells of RIPA lysis buffer (Radio immunoprecipitation assay buffer, Sigma-Aldrich) with 1% protease inhibitor (Sigma-Aldrich). Twenty μg of proteins were denatured at 95°C for 5 minutes in Laemmli buffer (BioRad) with 10% beta-mercaptoethanol (Merck) before plating into a pre-cast SDS-polyacrylamide 4-15% electrophoresis gel (BioRad). Migration was performed at 200V for 30min in 10x Tris/Glycine/SDS migration buffer (BioRad, cat #1610772). After migration, proteins were transferred to a Polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane, which was then blocked with 0.1% Tween tris-buffered saline (T-TBS) containing 5% milk. The membrane was incubated with a rabbit anti-NY-ESO-1 primary antibody (Cell Signaling Technology, Cat #45437) at 4°C overnight at 1:1000 or with a rabbit anti-Actin primary antibody (Cell Signaling Technology, cat # 3700) for one hour at room temperature at 1:1000. After 3 washes with 0.1% T-TBS, the membrane was incubated with horseradish peroxidase (HRP)-coupled anti-rabbit secondary antibody (Jackson Immuno Research) for one hour at 1:5000. Proteins were revealed with the Clarity™ Western ECL chemiluminescence kit (BioRad) by the Chemi DOC™ Imaging system (BioRad). The analysis of the images was performed with the ImageLab software.

Propidium iodide / annexin V Staining

CD8+ T cell clone N5.14, tumor cell lines or immature monocyte-derived DCs were seeded at 5.10^5 cells/mL and infected with MV or MVny (MOI=1) in a 48-well plate in their respective media. After 48h, 72h, 96h or 120h of infection, the cells were labeled with

propidium iodide (PI) / FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen Cat #556547) and analyzed by flow cytometry.

Intracytoplasmic staining of IFN- γ

HLA-A*0201+ or HLA-DPb1*0401+ immature DCs and tumor cells were seeded in a 96-well flat-bottom plate at 1.2×10^6 cells/mL in 100 μ L of their culture medium and were infected or not with MV or MVny (MOI=1). After 48 hours, some uninfected DC and tumor cells were incubated 1 hour at room temperature with 10 μ M of NY-ESO-1 (157-165) or (157-170) peptides and then washed. Uninfected, peptide-pulsed and infected DCs or tumor cells were co-cultured with the CD4+ T cell clone NY67 or with the CD8+ T cell clone M.117.167 in presence of 10 μ g/mL of brefeldin A (BioLegend, cat #420601). After 5 h of co-culture, cells were fixed with PBS 4% paraformaldehyde (PFA) (Electron Microscopy Sciences) for 10 minutes and labeled with a FITC-conjugated anti-CD4 (BD Pharmingen) or a FITC-conjugated anti-CD8 (BioLegend), and a PE-conjugated anti-IFN- γ (BD /Pharmingen, Cat # 554701) mAb, diluted in PBS with 0.1% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% saponin, for 30 minutes. Cells were then analyzed by flow cytometry with a BD FACS *Canto II* cytometer. The software *Diva* was used for the analysis.

MVgfp replication in monocyte-derived DC, M88 melanoma cell line and N5.14 CD8+ T cell clone

N5.14 CD8+ T cell clone, M88 melanoma cell line and monocyte-derived DCs were seeded in a 48-well plate at $5 \cdot 10^5$ in 800 μ L of their respective culture media. They were exposed to MVeGFP (MOI=1). The fluorescence was recorded by time-lapse microscopy using a *Widefield Leica DMI8, driven by Metamorph v7.8 software* (Molecular Devices), with

environmental control (Temperature, humidity and CO₂) for 120h using a x10 objective. Fluorescence was calculated from two different fields per wells with the *ImageJ* software [28].

RT-PCR and qPCR

The M88 melanoma cell line and iDCs were seeded in a 48-well plate at $5 \cdot 10^5$ cells/mL and $2 \cdot 10^6$ cells/mL, respectively, in 500 μ L of their respective culture media. They were exposed to MV or MVny (MOI=1). After 48h, cellular RNAs were extracted using the Nucleospin® RNA plus kit (Macherey-Nagel, Cat #740984.10) and 250ng were reverse-transcribed (Invitrogen, Cat #28025013). The qPCR reaction is then performed using Master mix Maxima SYBR Green/ROX qPCR (Thermo Scientific, Cat #K0253). The expression of NY-ESO-1 was measured using a pair of QuantiTect primers for NY-ESO-1. NY-ESO-1 gene expression was normalized against the expression of the housekeeping gene encoding the Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0 (RPLP0) using the $\Delta\Delta$ CT relative quantification method [29].

Surface staining of human monocyte-derived DCs

Monocyte-derived DCs were seeded in a 48-well plate at $5 \cdot 10^5$ cells/mL in 1mL of their culture medium. They were infected with MV or MVny (MOI=1), or treated with 1 μ g/mL lipopolysaccharide (LPS) (Sigma-Aldrich Cat #L2654-1 MG). After 48h of incubation, they were labeled with anti CD80 PE/Cy7-conjugated (IgG1k Biolegend Cat #305217), an anti-CD83 FITC-conjugated (IgG1k Biosciences Cat #556910) and an anti-CD86 APC-conjugated (IgG1k BD Biosciences Cat #555660) mAb diluted in PBS with 0.1% BSA. Cells were then fixed in PBS with 1% PFA for flow cytometric analysis with a BD FACS *Canto II* cytometer and the Diva software.

Data formatting and statistical analysis

The data were formatted using *GraphPad Prism v8*. Statistical significance was determined by the Mann-Witney Wilcoxon signed ranks test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Results

MVny induces NY-ESO-1 expression in human melanoma cells and cell lysis

MVny was generated by inserting the gene encoding the tumor associated antigen NY-ESO-1 in the genome of the Schwarz MV between the genes encoding P/V/C and M proteins (Figure 1A). The recombinant MVny virus was obtained by reverse genetics using a helper-cell-based system and amplified on Vero cells. The modified virus replicated similarly to the parental Schwarz strain of MV and expressed high levels of NY-ESO-1 protein in infected Vero cells (Figures 1B and 1C).

We previously described that a majority of human melanoma cell lines are permissive *in vitro* to MV replication due to defects in their antiviral type I interferon pathway [11]. In this experiment, we evaluated by western blot if the tumor antigen NY-ESO-1 is expressed after *in vitro* exposure of five melanoma cell lines to MVny, using the human M18 melanoma cell line that expresses NY-ESO-1 as a control. First, we observed that among the melanoma cell lines studied, two cell lines, M18 and IPC277/5, expressed NY-ESO-1 (Figure 2A). After 48h of exposition to MVny, the five melanoma cell lines expressed high levels of NY-ESO-1 (Figure 2B). NY-ESO-1 expression induced by MVny was higher than its spontaneous expression in M18 and IPC277/5.

We then assessed by propidium iodide and annexinV staining if exposition of the 6 melanoma cell lines to MV or MVny led to cell lysis. After 48h, it was often too early to detect lysis induced by MV (Figures 3A and 3B). However, we detected about 15% more cell death when IPC277/5 cells were infected with both viruses. We observed around 40% and 30% additional cell death in M18 and M88 induced by MVny compared to MV, respectively. After 120h, the same level of cell death was induced by MV and MVny in all cell lines, except for M199 that was better lysed by MV (Figure 3C and 3D). We also observed that M45 was quite resistant to the oncolytic activity of both viruses showing only around 10% lysis. Altogether,

these results show that MVny has an equivalent oncolytic activity compared to MV that is faster for a few melanoma cell lines such as M18 and M88.

MVny induces recognition of melanoma cell lines by NY-ESO-1-specific CD4+ and CD8+ T cell clones

To determine whether HLA-A*0201+ melanoma cell lines M199 is able to present the NY-ESO-1(157-165) peptide after infection by MVny, we measured IFN- γ production by M117.167, a human CD8+ T cell clones specific for the complex HLA-A*0201/NY-ESO-1(157-165) (Figure 4A-C). The M117.167 clone was unable to recognize M199 alone or exposed to MV, whereas it was able to produce IFN- γ in response to M199 pulsed with NY-ESO-1(157-165) peptide or after infection with MVny. This production of IFN- γ by M117.167 in response to MVny infected M199 cell lines was modest after 48h (Figures 4A and 4C), but reached a high level comparable to the production observed in response to 10 μ M of peptide after 120h (Figures 4B and 4C). In the same experiments, we also assessed M117.167 response to the autologous HLA-A*0201+ tumor cell lines M117. This cell line and the M117.167 T cell clone were obtained from the same melanoma biopsy. Non-infected M117 was recognized by M117.167 and this recognition was comparable after peptide loading or infection by MV or MVny (Figure S1). These results suggest that the M117.167 T cell clone recognized low amount of antigen, since we failed to detect NY-ESO-1 protein by western blot in the non-infected M117 cell line (Figure 2).

We also used NY67, a human CD4+ T cell clone specific for the HLA-DPB1*0401/NY-ESO-1(157-170) complex, to determine if the HLA-DPB1*0401+ melanoma cell line M88 was able to present the NY-ESO-1(157-170) peptide after infection by MVny (Figure 4D to 4F). The NY67 clone was unable to recognize M88 alone or exposed to MV, whereas IFN- γ was produced in response to M88 pulsed with NY-ESO-1(157-170) peptide or after infection with

MVny. This production of IFN- γ by NY67 in response to the MVny-infected M88 cell line was comparable to the production observed in response to 10 μ M of peptide after 48h of infection (Figure 4D and 4E) and then decreased after 120h (Figure 4D and 4F) .

Altogether, these experiments show that the expression of NY-ESO-1 by melanoma cell lines after infection by MVny allows the cells to present efficiently the tumor antigen to CD4+ and CD8+ T cells via HLA class II and I molecules, respectively.

MVny induces NY-ESO-1 expression in human monocyte-derived DC and cell lysis

We first analyzed MV replication in monocyte-derived DC using MV encoding the enhanced green fluorescent protein (MVeGFP). Fluorescence was detected as soon as 20h after virus exposition in DC and M88 melanoma cells (Figure 5A). While in M88 cell line fluorescence reached a mean plateau around 250 FU after 96h of culture, in DC fluorescence peaked at a mean level of 8 FU after 30 hours and then slowly decreased. At fluorescence peak, DC that were permissive to MV replication appeared slightly green in the middle of non-fluorescent DC aggregates (Figure 5B). We failed to detect any fluorescence after exposition of the human CD8+ T cell clone N5.14 to MVegfp (Figure 5A). These results show that MV replicates moderately in monocyte-derived DC, confirming our previous observation [3].

We then measured by RT-PCR and western blot the NY-ESO-1 expression in monocyte-derived DC exposed for 48h to MV or MVny. As expected, NY-ESO-1 was not expressed by uninfected DC or DC infected with MV, whereas expression was detected in DC exposed to MVny (Figure 5C). However, the amount of NY-ESO-1 protein in MVny-infected DC was lower than in MVny-infected M88 cell line (Figure 5D).

We evaluated monocyte-derived DC cell death after exposition to MV or MVny using propidium iodide / annexin V staining (Figure 6). We observed that MVny induced cell death

faster than MV in both monocyte-derived DC and M88 melanoma cells. We did not observe cell death of N5.14 CD8⁺ T cells when exposed to MV or MVny.

We then assessed if MVny was able to induce DC maturation. DC maturation was observed 48h after infection by MV or MVny when more than a half of DC are still alive, using LPS exposed DC as a positive control. MVny induced DC maturation more efficiently than MV, based on CD80, CD83 and CD86 expression and less efficiently than LPS (Figure 7).

Altogether these results show that MVny is able to induce maturation of monocyte-derived DC and expression of small amounts of NY-ESO-1 proteins, but also to induce significant DC cell death.

MVny induces recognition of DC by NY-ESO-1-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell clones

We finally determined if monocyte-derived DC exposed to MVny were able to present the NY-ESO-1 antigen to specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells. The NY-ESO-1 specific CD8⁺ T cell clone M117.167 strongly responded by IFN- γ production when exposed to MVny-infected HLA-A*0201⁺ DC or pulsed with 10 μ M specific peptide, while it produce low level of IFN- γ in response to non-infected or MV-infected DC (Figure 8). Similarly, the NY-ESO-1 specific CD4⁺ T cell clone NY67 produced high amounts of IFN- γ in response to DC exposed to MVny-infected DC or pulsed with 10 μ M of peptide, while it produced low levels in response to non-infected or MV-infected HLA-DPB1*0401⁺ monocyte-derived DC (Figure 8). In this experiment, we also observed a low amount of IFN- γ that is produced by both clones in response to MV-infected DC. This low IFN- γ amount is due to type I IFN produced by DC in response to MV, since it can be inhibited by ruxolitinib that is an inhibitor of JAK1/2 and consequently of the IFN-a/-b receptor signaling (supplemental figure 2). In the meantime, the recognition of MVny-infected DC by the clones is not altered by ruxolitinib. Thus, MVny-

infected DC are able to express the NY-ESO-1 and to present efficiently peptides from this tumor antigen to CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes through HLA molecules.

Discussion

In a previous study, we showed that a majority of melanoma cell lines are sensitive to the oncolytic activity of the Schwarz strain of MV due to defects of the antiviral type I interferon pathway in tumor cells [11]. In this study, we show that the attenuated Schwarz MV encoding human NY-ESO-1 is able to express this tumor antigen in infected melanoma tumor cells, while retaining its oncolytic activity. Upon infection of melanoma cells, NY-ESO-1 is strongly expressed and NY-ESO-1 peptides (157-165 and 157-170) are efficiently presented by infected tumor cells to specific CD8⁺ and CD4⁺ T cells by HLA class I and II molecules. We also show that MVny replicates modestly in monocyte-derived DCs compared to melanoma cells, allowing DCs to present NY-ESO-1 peptides to specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Altogether, these results demonstrate that MVny displays an oncolytic activity against melanoma cell lines and induces NY-ESO-1 peptides presentation not only by tumor cells, but also by antigen presenting cells such as monocyte-derived DCs.

Recently, Elena Busch and collaborators showed that MV can be modified to encode TAAs [22]. They demonstrated using mouse cells that TAAs are expressed by tumor and dendritic cells after TAA-encoding MV infection and that they are presented to CD8⁺ T cells. In this study, we confirm their finding using human cells. We further show that MV encoding TAA can induce HLA class II presentation by tumor cells and DCs to CD4⁺ T cells.

We observed that MVny induced a faster cell death than MV in melanoma cell lines and DCs. The expression of NY-ESO-1 seems toxic for cells. It is difficult to formulate hypothesis regarding this increased toxicity of MVny since the role of NY-ESO-1 is not well defined [10]. This faster cell death induction might explain why this virus induces stronger DC maturation. We and other previously showed that MV induces immunogenic cell death allowing the release of danger signals that mature DC [3, 30]. With faster DC cell death induced by MVny, it is possible that more danger signals were released when DC maturation was measured.

We previously showed that melanoma cell lines expressing NY-ESO-1 and HLA class II molecules can present NY-ESO-1 peptides to NY-ESO-1-specific CD4⁺ T cells by an exogenous pathway [31]. Indeed, some NY-ESO-1 proteins are released by melanoma cells and re-captured to reach the endo-lysosomal HLA class II presentation pathway. We also reported that MV-induced cell death allows the release of high amounts of NY-ESO-1 proteins leading to an increase HLA class II presentation of this antigen by living tumor cells around [32]. Thus, MVny would reinforce NY-ESO-1 expression in tumors and its release by tumor cells leading to a strong presentation to CD4⁺ T cells. Furthermore, NY-ESO-1 expression in melanoma tumors is often heterogeneous, exhibiting a mosaic-like pattern with only isolated parts of the tumor expressing this antigen [33]. MVny may be an interesting tools to spread NY-ESO-1 antigen presentation to regions of the tumor that do not express NY-ESO-1.

The frequency of patients with NY-ESO-1-expressing melanoma correlates with the stage of the disease. This expression is low in first stages and reaches around 45% in metastatic melanoma [33–35]. MVny may be interesting to induce or reinforce NY-ESO-1 specific T cell responses for patient with tumors that express this tumor antigen. Several immunotherapy clinical trials are on-going to induce CD4⁺ and CD8⁺ T cell response against NY-ESO-1 [10]. For exemple, the adoptive transfer of an autologous HLA-DPB*0401/NY-ESO-1(157-170)-specific CD4⁺ T lymphocyte clone in a metastatic melanoma patient allowed the rejection of tumors and the emergence of other TAA-specific T cells, thereby suggesting the induction of antigen spreading [36]. In addition, the adoptive transfer of CD8⁺ T cells harboring a transgenic T cell receptor against NY-ESO-1 resulted in clinical benefits in HLA-A*0201+ melanoma patients [37]. Thus, strategies aiming at increasing the presentation of this TAA by DC and tumor cells not only through the HLA class I pathway, but also through the class II pathway, should be envisaged to stimulate NY-ESO-1 antitumor immune responses. The use of oncolytic

viruses expressing NY-ESO-1, such as MVny, may be a valuable therapeutic strategy to achieve this goal.

Acknowledgments

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

Founding

This work was supported by “La Ligue Régionale Grand Ouest contre le Cancer” (CD16, CD22, CD44, CD49, CD72, CD79 and CD85), “l’association ARSMESO44 ”, “la Fondation ARC (PJA 20191209661)”, “l’Agence Nationale pour la Recherche (ANR-16-CE18-0016)”, and “LabEX IGO” program supported by the National Research Agency via the investment of the future program ANR-11-LABX-0016-01”.

Disclosure statement

FT and JFF are authors of patents on MV. FT owns equity in Oncovita, an oncolytic virotherapy company.

Author contributions

Experiments conception: FT and JFF

Experiments: MG, MI, AA, CCh, CCo, SD, VD, NB and JFF

Data analysis and manuscript writing: MG, NL, DF, NB, CB, FT and JFF.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author (jean-francois.fonteneau@inserm.fr) upon reasonable request.

References

1. Macedo N, Miller DM, Haq R, Kaufman HL (2020) Clinical landscape of oncolytic virus research in 2020. *J Immunother Cancer* 8
2. Achard C, Surendran A, Wedge ME, et al (2018) Lighting a Fire in the Tumor Microenvironment Using Oncolytic Immunotherapy. *EBioMedicine* 31:17–24
3. Gauvrit A, Brandler S, Sapede-Peroz C, et al (2008) Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response. *Cancer Res* 68:4882–92
4. Guillaume JB, Boisgerault N, Roulois D, et al (2013) Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Clin Cancer Res* 19:1147–58
5. Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P, Boon T (2014) Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 14:135–46
6. Meng X, Sun X, Liu Z, He Y (2021) A novel era of cancer/testis antigen in cancer immunotherapy. *Int Immunopharmacol* 98:107889
7. Gnjjatic S, Nishikawa H, Jungbluth AA, et al (2006) NY-ESO-1: review of an immunogenic tumor antigen. *Adv Cancer Res* 95:1–30
8. Jager E, Chen YT, Drijfhout JW, et al (1998) Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J Exp Med* 187:265–70
9. Wang RF, Wang HY (2017) Immune targets and neoantigens for cancer immunotherapy and precision medicine. *Cell Res* 27:11–37
10. Thomas R, Al-Khadairi G, Roelands J, et al (2018) NY-ESO-1 Based Immunotherapy of Cancer: Current Perspectives. *Front Immunol* 9:947

11. Allagui F, Achard C, Panterne C, et al (2017) Modulation of the Type I Interferon Response Defines the Sensitivity of Human Melanoma Cells to Oncolytic Measles Virus. *Current gene therapy* 16:419—428. <https://doi.org/10.2174/1566523217666170102110502>
12. Boisgerault N, Guillerme JB, Pouliquen D, et al (2013) Natural oncolytic activity of live-attenuated measles virus against human lung and colorectal adenocarcinomas. *Biomed Res Int* 2013:387362
13. Achard C, Boisgerault N, Delaunay T, 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. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6285>
14. Delaunay T, Achard C, Boisgerault N, et al (2020) Frequent Homozygous Deletions of Type I Interferon Genes in Pleural Mesothelioma Confer Sensitivity to Oncolytic Measles Virus. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 15:827—842. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.12.128>
15. Msaouel P, Opyrchal M, Dispenzieri A, et al (2018) Clinical Trials with Oncolytic Measles Virus: Current Status and Future Prospects. *Curr Cancer Drug Targets* 18:177—187
16. Backhaus PS, Veinalde R, Hartmann L, et al (2019) Immunological Effects and Viral Gene Expression Determine the Efficacy of Oncolytic Measles Vaccines Encoding IL-12 or IL-15 Agonists. *Viruses* 11
17. Speck T, Heidbuechel JPW, Veinalde R, et al (2018) Targeted BiTE Expression by an Oncolytic Vector Augments Therapeutic Efficacy Against Solid Tumors. *Clin Cancer Res* 24:2128—2137
18. Dispenzieri A, Tong C, LaPlant B, et al (2017) Phase I trial of systemic administration of Edmonston strain of measles virus genetically engineered to express the sodium iodide

- symporter in patients with recurrent or refractory multiple myeloma. *Leukemia* 31:2791–2798
19. Frantz PN, Barinov A, Ruffie C, et al (2021) A live measles-vectored COVID-19 vaccine induces strong immunity and protection from SARS-CoV-2 challenge in mice and hamsters. *Nat Commun* 12:6277
 20. Ramsauer K, Schwameis M, Firbas C, et al (2015) Immunogenicity, safety, and tolerability of a recombinant measles-virus-based chikungunya vaccine: a randomised, double-blind, placebo-controlled, active-comparator, first-in-man trial. *Lancet Infect Dis* 15:519–27
 21. Pol JG, Zhang L, Bridle BW, et al (2014) Maraba Virus as a Potent Oncolytic Vaccine Vector. *Molecular Therapy* 22:420–429. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.249>
 22. Busch E, Kubon KD, Mayer JKM, et al (2020) Measles Vaccines Designed for Enhanced CD8+ T Cell Activation. *Viruses* 12:242. <https://doi.org/10.3390/v12020242>
 23. Fonteneau JF, Larsson M, Somersan S, et al (2001) Generation of high quantities of viral and tumor-specific human CD4+ and CD8+ T-cell clones using peptide pulsed mature dendritic cells. *J Immunol Methods* 258:111–26
 24. Roulois D, Vignard V, Gueugnon F, et al (2011) Recognition of pleural mesothelioma by mucin-1(950-958)/human leukocyte antigen A*0201-specific CD8+ T-cells. *Eur Respir J* 38:1117–26
 25. Benlalam H, Labarrière N, Linard B, et al (2001) Comprehensive analysis of the frequency of recognition of melanoma-associated antigen (MAA) by CD8 melanoma infiltrating lymphocytes (TIL): implications for immunotherapy. *Eur J Immunol* 31:2007–2015. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200107\)31:7<2007::aid-immu2007>3.0.co;2-s](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200107)31:7<2007::aid-immu2007>3.0.co;2-s)

26. Coulais D, Panterne C, Fonteneau JF, Gregoire M (2012) Purification of circulating plasmacytoid dendritic cells using counterflow centrifugal elutriation and immunomagnetic beads. *Cytotherapy* 14:887–96
27. Combredet C, Labrousse V, Mollet L, et al (2003) A molecularly cloned Schwarz strain of measles virus vaccine induces strong immune responses in macaques and transgenic mice. *J Virol* 77:11546–54
28. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676–82
29. Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3:1101–8
30. Donnelly OG, Errington-Mais F, Steele L, et al (2011) Measles virus causes immunogenic cell death in human melanoma. *Gene Ther*
31. Fonteneau JF, Brilot F, Munz C, Gannage M (2016) The Tumor Antigen NY-ESO-1 Mediates Direct Recognition of Melanoma Cells by CD4+ T Cells after Intercellular Antigen Transfer. *J Immunol* 196:64–71
32. Delaunay T, Violland M, Boisgerault N, et al (2018) Oncolytic viruses sensitize human tumor cells for NY-ESO-1 tumor antigen recognition by CD4+ effector T cells. *Oncoimmunology* 7:e1407897. <https://doi.org/10.1080/2162402x.2017.1407897>
33. Velazquez EF, Jungbluth AA, Yancovitz M, et al (2007) Expression of the cancer/testis antigen NY-ESO-1 in primary and metastatic malignant melanoma (MM)—correlation with prognostic factors. *Cancer Immun* 7:11
34. Barrow C, Browning J, MacGregor D, et al (2006) Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage. *Clin Cancer Res* 12:764–71
35. Goydos JS, Patel M, Shih W (2001) NY-ESO-1 and CTp11 expression may correlate with stage of progression in melanoma. *J Surg Res* 98:76–80

36. Hunder NN, Wallen H, Cao J, et al (2008) Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N Engl J Med* 358:2698–703
37. Robbins PF, Kassim SH, Tran TL, et al (2015) A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: long-term follow-up and correlates with response. *Clin Cancer Res* 21:1019–27

Figure legends

Figure 1: Generation of MVny. (A) Schematic representation of pTM-MVny plasmid vector with the NY-ESO-1 ORF sequence inserted into an additional transcription unit between the PVC and M genes. The MV genome comprises the nucleoprotein (N), phosphoprotein (P), V and C accessory proteins, matrix (M), fusion (F), hemagglutinin (H) and polymerase (L) genes. Plasmid elements include the T7 RNA polymerase promoter (T7), hammerhead ribozyme (hh), hepatitis delta virus ribozyme (δ), and T7 RNA polymerase terminator (T7t). (B) Growth kinetics of MV (blue) and MVny (red) in Vero cells infected with an MOI of 0.1 (cell-associated virus titers are indicated in TCID₅₀/ml).

Figure 2: MVny induces NY-ESO-1 expression in human melanoma cell lines. (A) Western blot analysis of NY-ESO-1 antigen expression in six human melanoma cell lines (M18, M45, M88, M117, M199 and IPC 277/5). (B) Western blot analysis of NY-ESO-1 antigen expression in six melanoma lines (M18, M45, M88, M117, M199, and IPC277/5) non-infected (NI) or infected by MV or MVny for 48 hours.

Figure 3: MVny induces the lysis of human melanoma cell lines. Melanoma cell lines were cultured alone (NI) or with MV or MVny (MOI=1). After 48h (A-B) or 120h (C-D), cell death was measured by annexin V and Propidium iodide (PI) staining and flow cytometry. (A and C) One representative experiment with M88, M117 and M199 cell lines is shown. (B and D) Results (means + SD) of three independent experiments performed with M18, M45, M88, M117, M199, and IPC277/5 cell lines are shown. Percentages of dead cells are the sums of Annexin V+/PI-, Annexin V+/PI+ and Annexin V-/PI+ cells.

Figure 4: MVny induces the recognition of melanoma cell lines by NY-ESO-1-specific CD4+ and CD8+ T cell clones. (A-C) The HLA-A*0201+ melanoma cell line M199 was cultured alone (NI), with MV or MVny (MOI=1) during 48h (A) or 120h (B). Cells were collected and a part of M199 was pulsed with the NY-ESO-1 (157-165) for one hour and washed. Cells were co-cultured with the CD8+ T cell clone M117.167 for 5h in presence of brefeldin A and then fixed and stained for CD8 and intracellular IFN- γ . Fluorescence was analyzed by flow cytometry. (C) Results (means + SD) of three independent experiments are shown (C). (D-F) The HLA-DPb1*0401+ melanoma cell line M88 was cultured alone (NI), with MV or MVny (MOI=1) during 48h (D) or 120h (E). Cells were collected and a part of M88 was pulsed with the NY-ESO-1 (157-170) for one hour and washed. Cells were co-cultured with the CD4+ T cell clone NY67 for 5h in presence of brefeldin A, then fixed and stained for CD4 and intracellular IFN- γ . Fluorescence was analyzed by flow cytometry. (F) Results (means + SD) of three independent experiments are shown (F).

Figure 5: MVny replicates in human monocyte-derived DC and induces NY-ESO-1 expression.

(A) Human monocyte-derived DC, the M88 melanoma cell line and N5.14 CD8+ T cell clones were exposed to MVgfp (MOI=1) during 120h. The average fluorescence intensity is calculated from two different locations in the same culture well per condition. (B) Microscopy picture of monocyte-derived DC 30h after exposition to MVgfp. (C-D) Monocyte-derived DC and M88 melanoma cell line were exposed to MV or MVny (MOI=1). (C) After 48h, cells were collected and *CTAG1B* expression was measured by RT-qPCR and normalized to the expression of the housekeeping gene *RPLP0*. (D) After 48h, NY-ESO-1 and Actin were detected by western blot.

Figure 6: MVny induces the lysis of human monocyte-derived DC. Human monocyte-derived DC, the M88 melanoma cell line and N5.14 CD8+ T cell clones were exposed to MV (MOI=1).

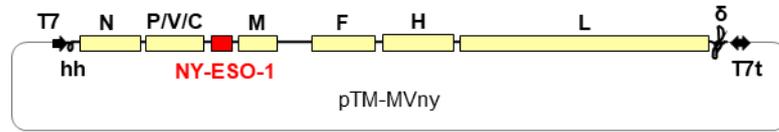
(A-B) After 48h, 72h, 96h and 120h, cell death was measured by annexin V and propidium iodide (PI) staining and flow cytometry. (B) Results (means + SD) of four independent experiments are shown. Percentages of dead cells are the sums of Annexin V+/PI-, Annexin V+/PI+ and Annexin V-/PI+ cells and was retracted from 100 to obtain % viability.

Figure 7: MVny induces the maturation of human monocyte-derived DC. Monocyte-derived DC were cultured alone or with LPS, MV or MVny (MOI=1) for 48h. (A) Surface expression of CD80, CD83 and CD86 was measured by flow cytometry. (B) Results (means + SD) of the relative mean of fluorescence intensity (RMFI) from four independent experiments. RMFI is obtained by the ratio of the mean fluorescence of cells stained by the specific mAb by the mean fluorescence of cells stained with the isotype control.

Figure 8: MVny induces the recognition of HLA-A*0201+ and HLA-DPb1*0401+ DC by NY-ESO-1-specific CD8+ and CD4+ T cell clones. (A) HLA-DPb1*0401+ monocytes-derived DC were cultured alone (NI) or with MV or MVny (MOI=1) during 48h. Cells were collected and a part of DC were pulsed with the NY-ESO-1 (157-170) for one hour and washed. Cells were co-cultured with the CD4+ T cell clone NY67 for 5h in presence of brefeldin A, then fixed and stained for CD4 and intracellular IFN- γ . Fluorescence was analyzed by flow cytometry. (B) HLA-A*0201+ monocytes-derived DC were cultured alone (NI) or with MV or MVny (MOI=1) during 48h. Cells were collected and a part of DC were pulsed with the NY-ESO-1 (157-165) for one hour and washed. Cells were co-cultured with the CD8+ T cell clone M17.167 for 5h in presence of brefeldin A, then fixed and stained for CD8 and intracellular IFN- γ . Fluorescence was analyzed by flow cytometry. (C) Results (means + SD) of the percentage of CD4+/IFN- γ + or CD8+/IFN- γ + cells of four independent experiments are shown.

Figure 1

A



B

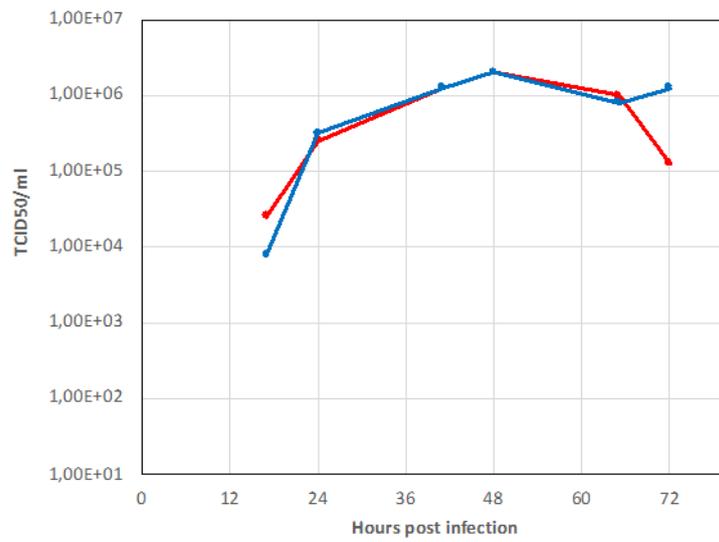


Figure 2

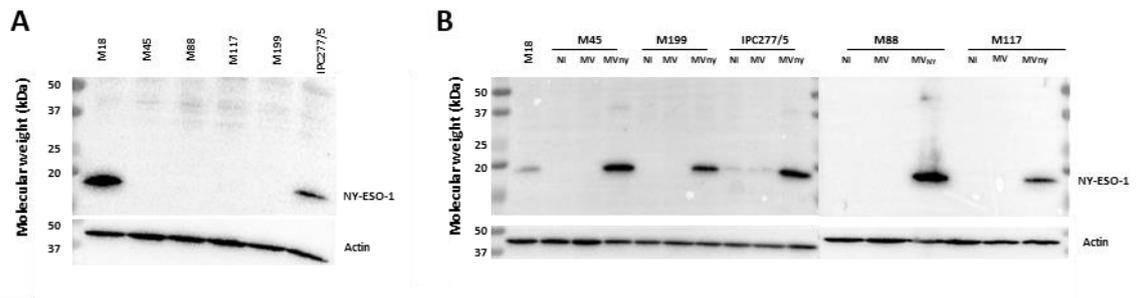


Figure 3

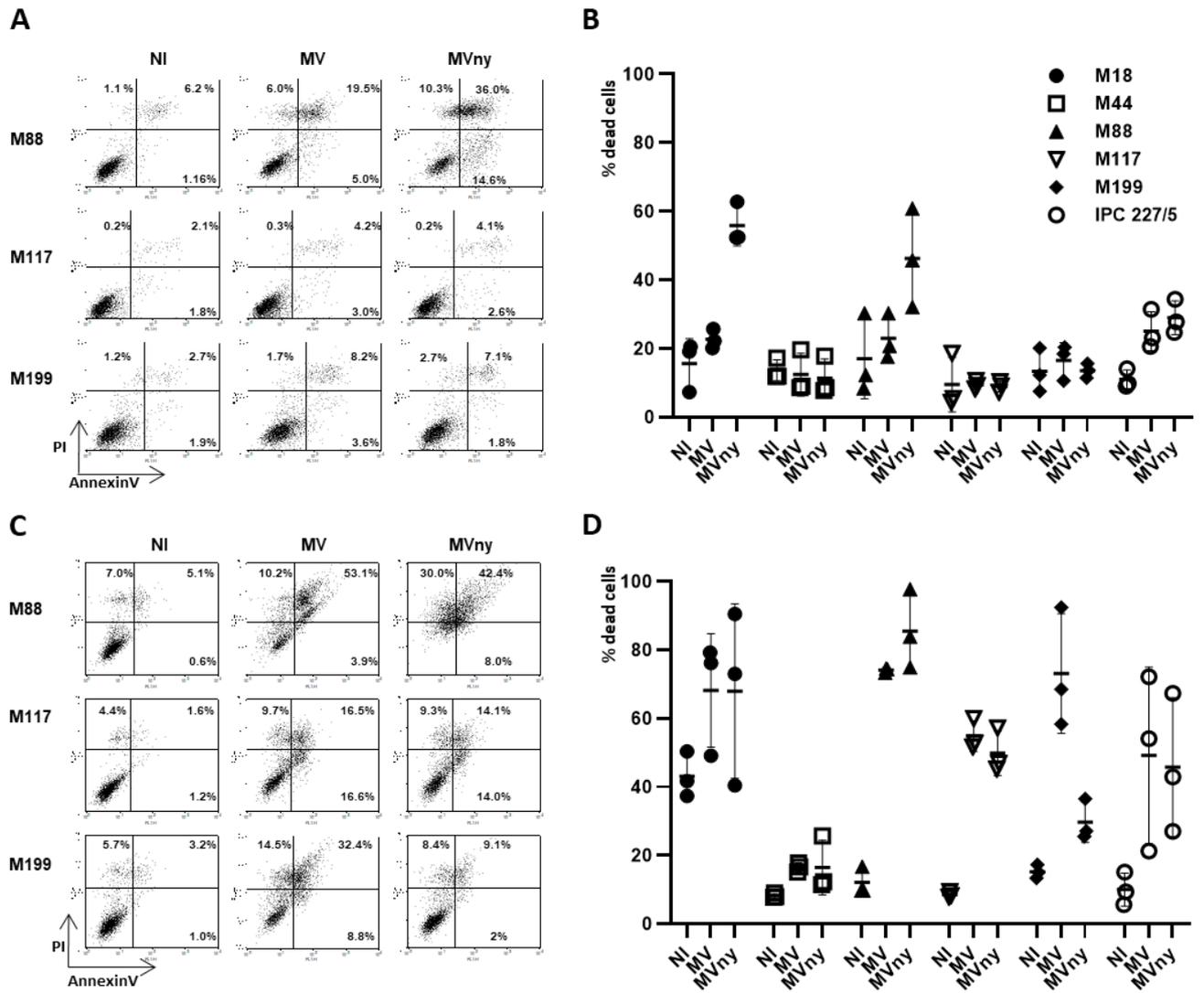


Figure 4

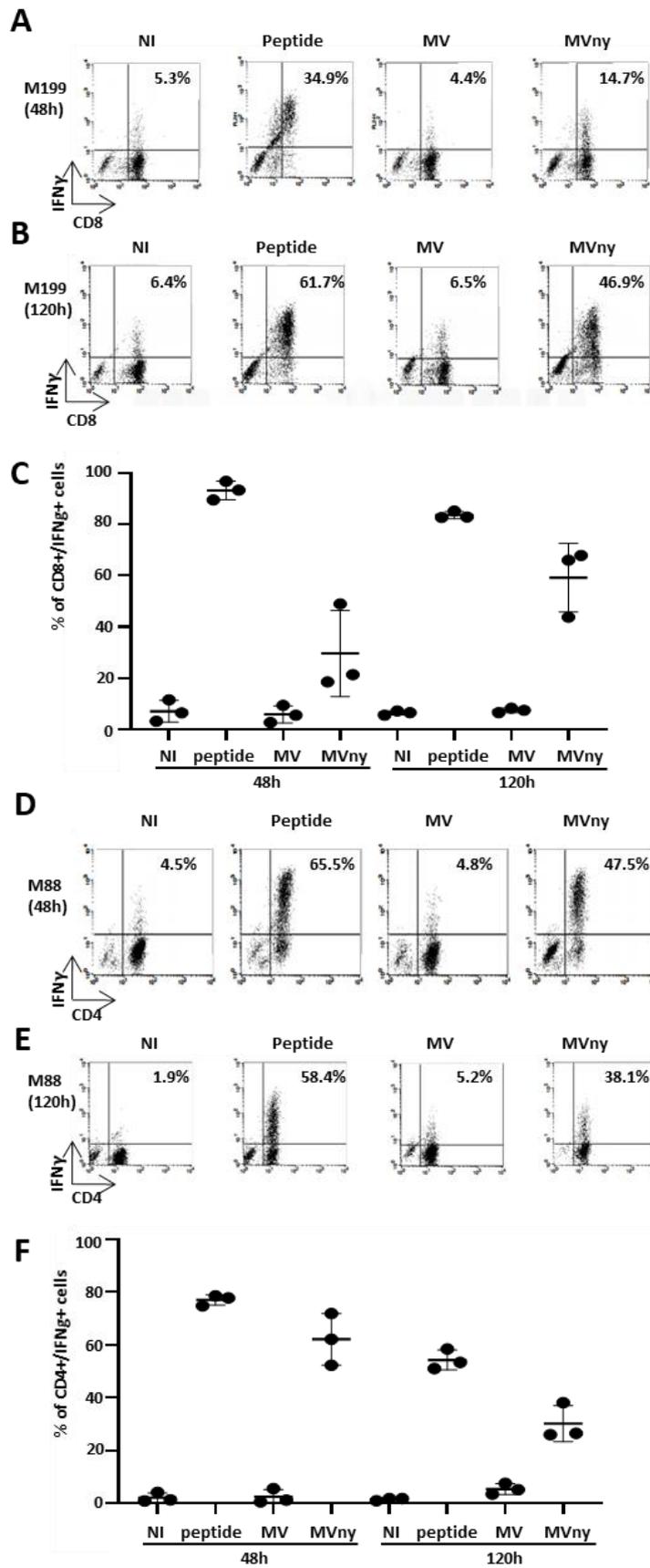


Figure 5

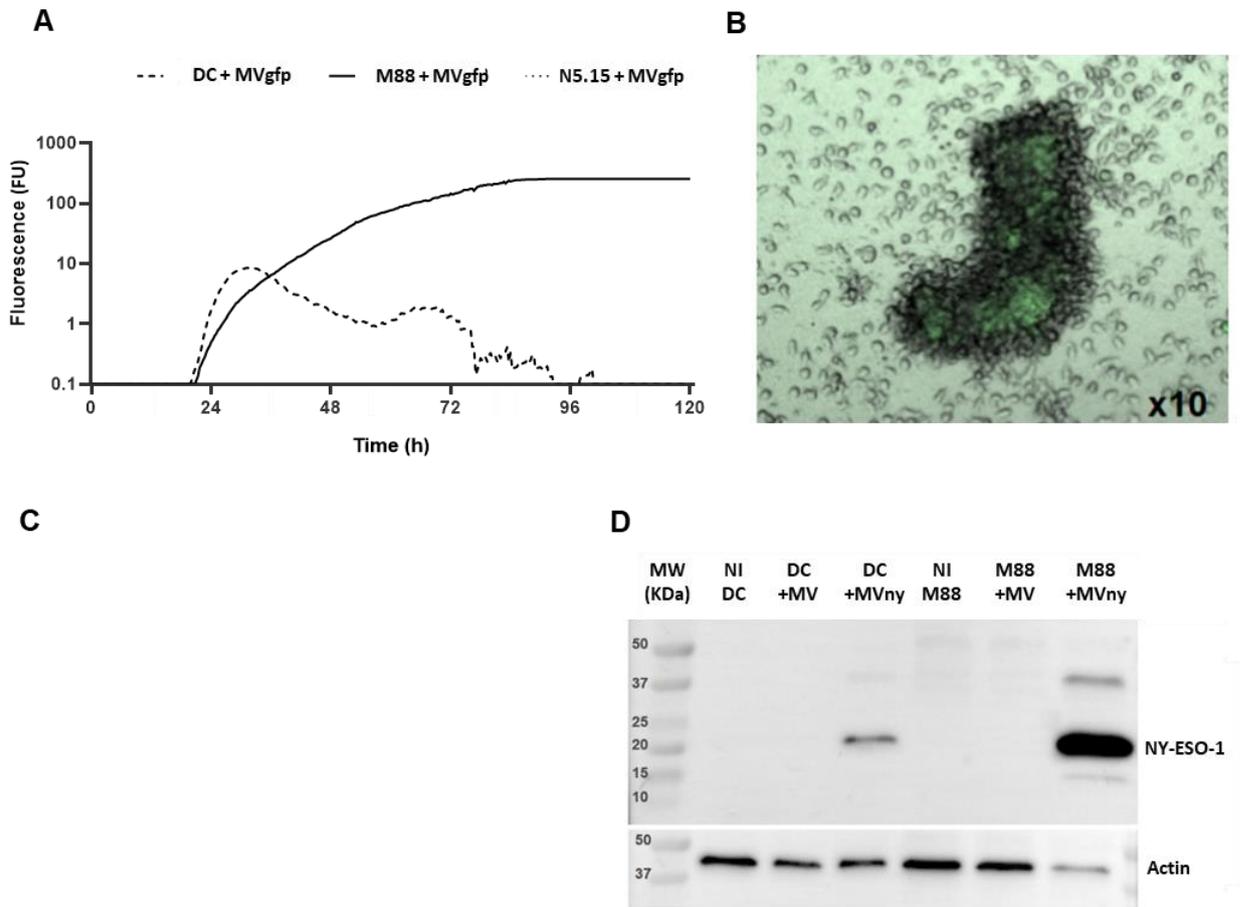


Figure 6

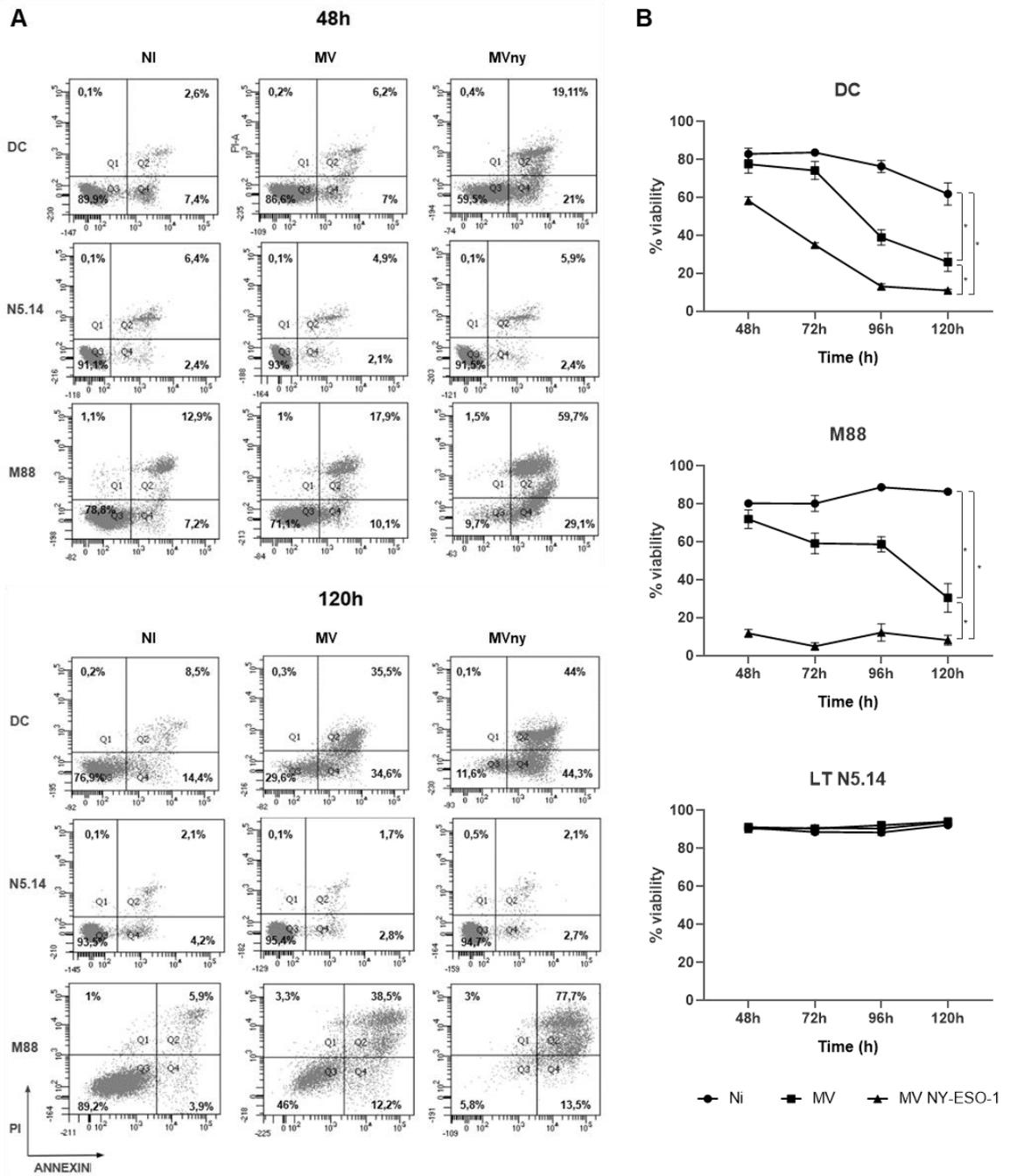
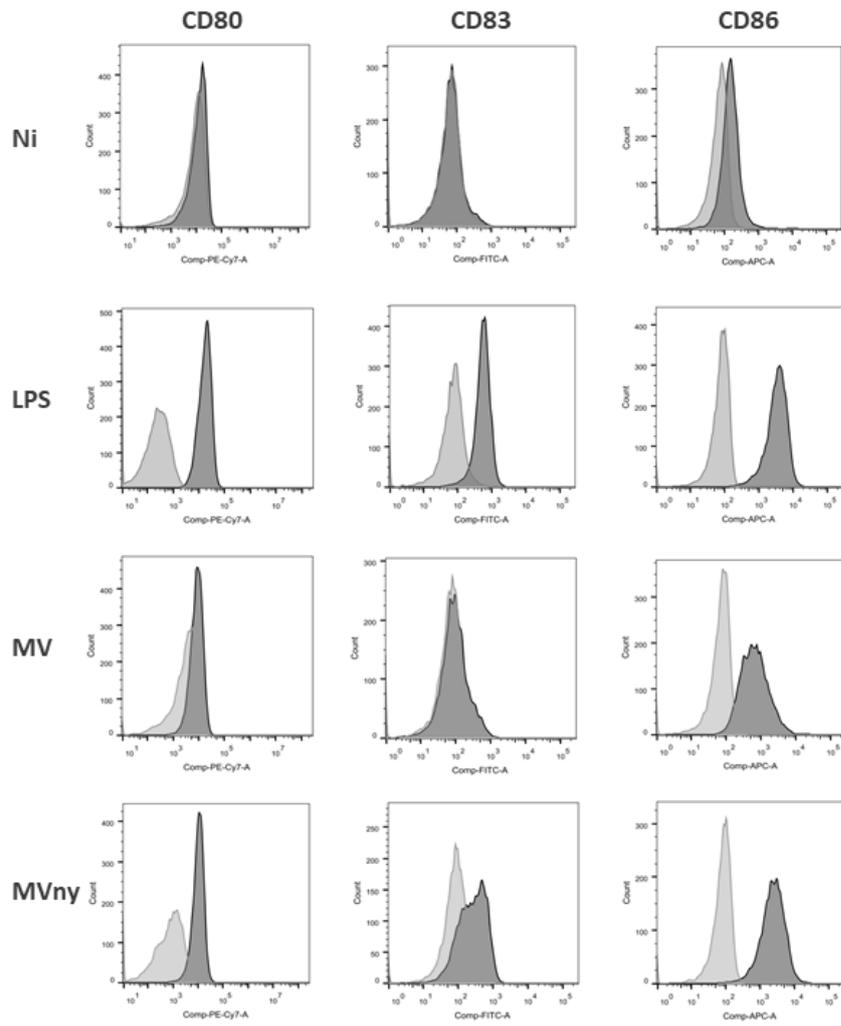


Figure 7

A



B

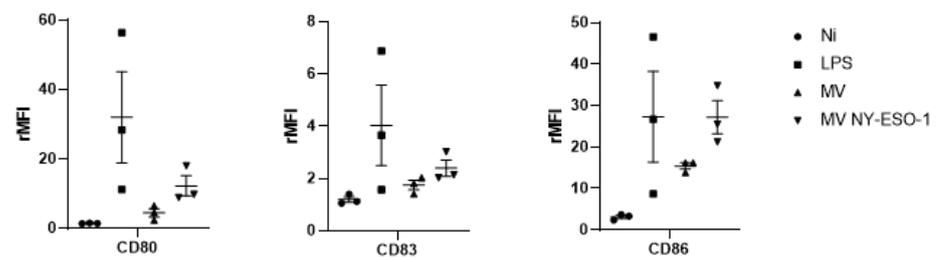
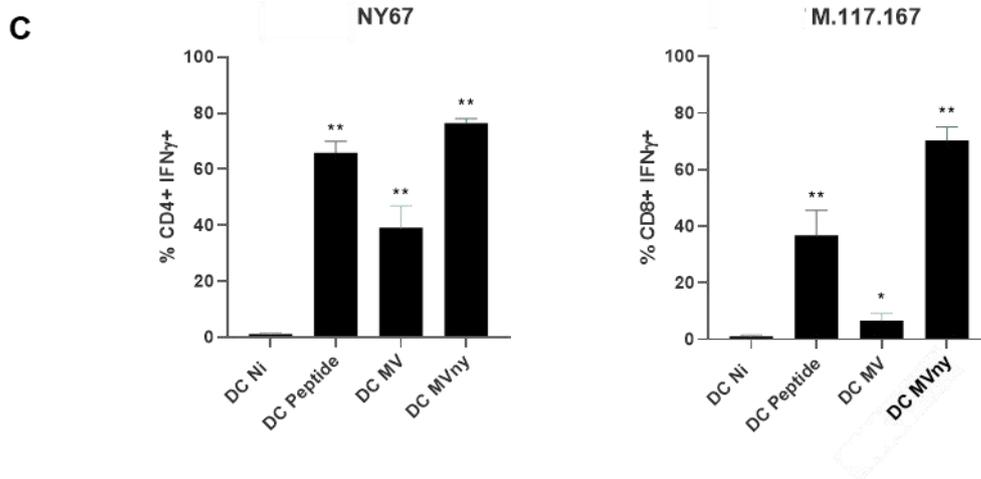
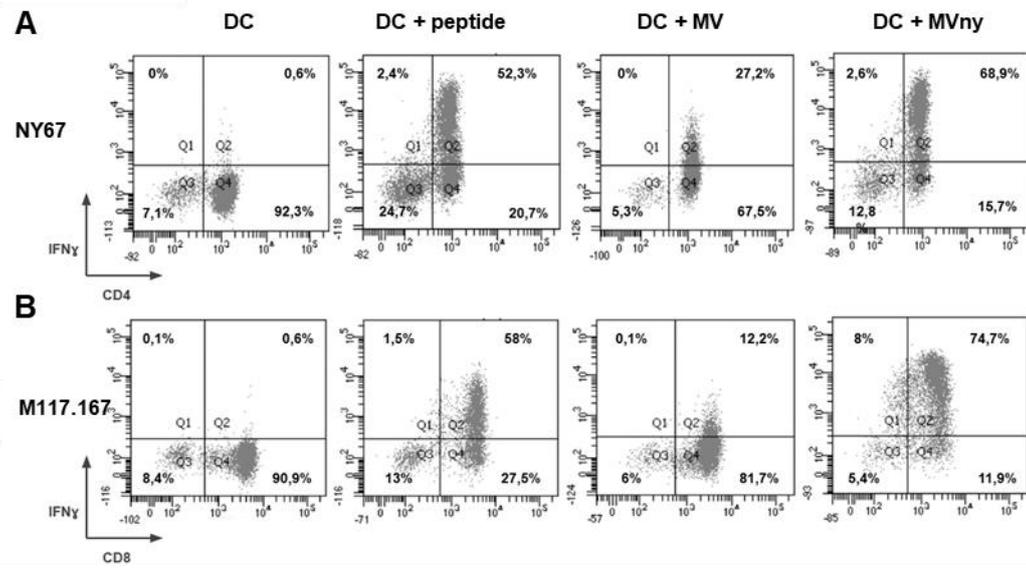
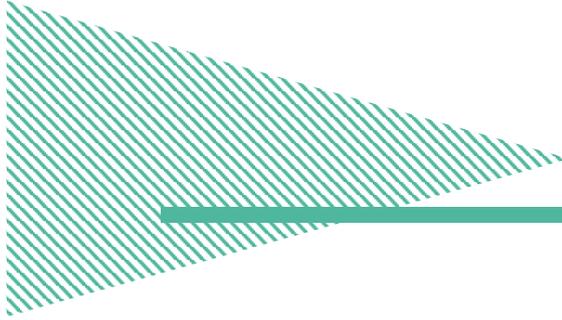


Figure 8



DISCUSSION ET PERSPECTIVES



Le MPM est un cancer particulièrement agressif pour lequel la médiane de survie est estimée à environ 1 an. Son mode de développement atypique explique en partie le diagnostic tardif de la pathologie. En effet, la moyenne d'apparition des premiers symptômes est de 40 ans après l'exposition à l'amiante, sa principale étiologie. Même si un grand nombre de pays ont aujourd'hui interdit l'utilisation de l'amiante, son utilisation est encore courante dans d'autres, comme la Chine, la Russie, l'Inde, le Canada ou encore les Etats-Unis. Face à cette pathologie, un très faible nombre de patients est éligible à la chirurgie. Celle-ci est particulièrement traumatisante et surtout sans bénéfice clinique avéré. La majorité des patients reçoivent un traitement chimiothérapeutique conventionné alliant le cisplatine et le pémétréxed. Malheureusement cette combinaison médicamenteuse ne permet de prolonger la médiane de survie des patients que de quelques mois³⁷. Il est donc nécessaire de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin d'allonger la durée de vie en bonne santé des patients atteints de MPM.

Dans ce but, notre équipe étudie la virothérapie oncolytique. Cette approche thérapeutique consiste en l'utilisation de virus répliquatifs qui vont infecter spécifiquement les cellules tumorales et induire une forme de mort cellulaire très immunogène stimulant la réponse immunitaire antitumorale. L'immunothérapie oncolytique connaît actuellement ses premiers succès avec la mise sur le marché en 2015 d'un premier OV, l'imlygic™, pour le traitement du mélanome et l'évaluation en essai clinique de phase III de plusieurs autres. Notre équipe étudie plusieurs OV différents, notamment la souche vaccinale atténué Schwarz du virus de la rougeole (MV) en collaboration avec le Dr Frédéric Tangy de l'Institut Pasteur qui produit ce virus. Nous étudions aussi le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), qui permet de tester cette approche dans des modèles animaux, le virus de la vaccine délété pour les gènes de la thymidine kinase (TK) et de la ribonucléotide réductase (RR) (VV TK-RR-) ainsi que le Myxomavirus (Myxo). Nous étudions particulièrement les mécanismes de sensibilité des cellules tumorales aux OV et leurs effets sur la réponse immunitaire antitumorale.

Lors de ma thèse, j'ai tout d'abord eu l'opportunité d'étudier les capacités oncolytiques du MV dans un modèle de lignées tumorales de MPM sous forme de sphéroïdes récemment développé par l'équipe. J'ai tout pu montrer que les sphéroïdes de MPM sont peu permissifs à la répllication du MV de façon indépendante de la

réponse IFN I. Grâce à une analyse transcriptomique comparative 2D et 3D, j'ai ensuite pu caractériser les voies de signalisation dérégulées dans les sphéroïdes et ainsi identifier la nature de la résistance au MV. J'ai montré que les sphéroïdes de MPM présentent une matrice extracellulaire typique d'une fibrose associée à un environnement inflammatoire. Ces conditions environnementales, qui peuvent avoir un impact direct sur la propagation et la réplication des OV, provoquent également la baisse des capacités de prolifération cellulaire. La mise en dormance des cellules de MPM cultivées en sphéroïdes induit une résistance à la réplication du MV. En effet, j'ai pu montrer que la réactivation du cycle cellulaire par l'EGF est corrélée à la restauration des capacités oncolytiques du MV dans les sphéroïdes.

Dans un deuxième temps, j'ai eu l'occasion, en compagnie de Mohamed Idjellidaine, d'étudier les capacités du MVny à induire la mise en place d'une réponse immunitaire antitumorale spécifique. Nous avons caractérisé les interactions du virus avec les cellules tumorales mais aussi les DCs, principales cellules présentatrices d'antigène essentielles à l'induction d'une réponse T antitumorale. Nous avons montré que le MVny se réplique dans les cellules tumorales et peu dans les DC, provoquant une mort cellulaire importante. Nous avons également mis en évidence une expression de NY-ESO-1 dans ces cellules infectées. Nous avons ensuite observé que le MVny induit l'activation des DC avec une augmentation du marqueur de maturation CD83 et des molécules de costimulation CD80 et CD86. Enfin, en utilisant des clones de lymphocytes T CD4+ et CD8+ humains spécifiques de NY-ESO-1, nous avons montré que les cellules tumorales et les DCs infectées par le MV-NY-ESO-1 présentent fortement cet antigène par les molécules HLA de classe I et II.

La prolifération réduite des lignées cellulaires de mésothéliome cultivées en sphéroïdes diminue la réplication du virus oncolytique atténué de la rougeole

A. Pertinence du modèle de culture

Les sphéroïdes sont des agrégats tridimensionnels de cellules qui se forment spontanément dans un contexte de culture favorisant les contacts cellulaires. Les sphéroïdes et les cultures en 3 dimensions présentent des caractéristiques particulièrement intéressantes pour l'étude des tumeurs. En effet, pouvant être associées ou non à des cellules caractéristiques du microenvironnement tumoral, ces structures présentent des interactions physiologiquement plus pertinentes qu'un simple modèle de culture en 2 dimensions. Cela se traduit par des profils d'expression de gènes et de voies de signalisation, une hétérogénéité et une complexité structurelle reflétant bien mieux les tumeurs *in vivo*, notamment dans le cas du MPM⁴³⁵.

Ainsi, les sphéroïdes sont de plus en plus utilisés pour l'étude des mécanismes de progression tumorale, des phénomènes de résistance aux traitements et pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Néanmoins, les caractéristiques de ces modèles peuvent varier considérablement en taille, en forme, en densité et en composition cellulaire, selon les conditions de culture et les lignées utilisées. Ces variations peuvent avoir un impact sur la réponse aux traitements et sur la validité des résultats. Notamment, une étude concernant la culture de lignées de MPM dans différents modèles en 3 dimensions a pu mettre en évidence des différences significatives dans la réponse aux chimiothérapies en fonction du mode de culture 3D⁴³⁵. Par conséquent, il est impératif de caractériser au préalable le modèle utilisé, afin de pouvoir interpréter en toute conscience les résultats obtenus et les mettre de façon pertinente en parallèle avec la réalité biologique. L'étude de nos lignées cultivées sous forme de sphéroïdes a pu montrer l'acquisition de caractéristiques spécifiques au MPM. Notamment, de nombreuses voies ont été montrées comme dérégulées en 3D, conférant aux cellules des sphéroïdes une expression génique proche de la physiologie du MPM.

Tout d'abord, comme dans le MPM, la taille de nos sphéroïdes nous a permis de simuler un gradient d'oxygène et de nutriments. Le MPM présente en effet d'importantes zones d'hypoxie, qui ont d'ailleurs été incriminées dans les phénomènes de résistance aux traitements^{447,448}. Notamment, il a été montré que des modèles de sphéroïdes de MPM présentent une meilleure adaptation face à l'hypoxie que les modèles 2D, leur conférant une résistance à la chimiothérapie à base de pémétréxed et d'inhibiteurs de topoisomérase³⁴². Dans notre modèle, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'expression des gènes caractéristiques de la voie HIF-1 de l'hypoxie. Cependant, la présence des gradients de nutriments et d'oxygène induit la formation d'un noyau nécrotique au centre de nos sphéroïdes comme en témoignent la dérégulation des voies de signalisation de p53 et de la nécroptose. Le phénomène de nécrose est particulièrement bien décrit dans le MPM et est d'ailleurs considéré comme prédictif du temps de survie des patients^{449,450}. Nous envisageons de mettre concrètement en évidence la mise en place de ce centre nécrotique au sein de nos sphéroïdes grâce à l'imagerie confocale des caspases activées.

Nous supposons que la présence de ces cellules nécrosées induit l'établissement d'une forte inflammation dans le microenvironnement de nos sphéroïdes. Celle-ci se traduit dans notre étude transcriptomique à travers la dérégulation des voies TNF- α , NF- κ B et IL-17, avec notamment la surexpression du trio de cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et TNF- α . En effet, les cellules cultivées en 3D expriment davantage de gènes ayant des fonctions pro-inflammatoires et anti-apoptotiques tels que *BCL2A1*, *IL1B*, *IL1R1*, *IL6*, *IL17RB*, *PTGS2*, *TNFRS1B*, *IKBK2* et *IKBKG*. De nombreux gènes codant pour des chimiokines, notamment responsables du recrutement de cellules immunitaires, sont également trouvés surexprimés, tels que *CCL11*, *CCL7*, *CSF2*, *CSF3*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*, *CXCL6*, *CXCL8* et *CXCL10*. Ainsi, le microenvironnement inflammatoire des sphéroïdes imite particulièrement celui du MPM, qui est un cancer principalement induit par l'inflammation causée par la présence de fibres d'amiante²⁸⁹. En effet, il a été montré que la mort cellulaire induite par l'amiante est une forme régulée de nécrose inductrice de cancérogenèse. L'exposition des cellules induit l'expression de signaux inflammatoires, notamment la translocation de la protéine HMGB1 et d'IL-1 β mature dans l'espace extracellulaire. Ces facteurs recrutent les cellules immunitaires, dont les macrophages, les incitant à sécréter d'autres cytokines pro-inflammatoires, notamment le TNF- α . Le

déclenchement de cette réponse inflammatoire chronique protège les cellules de la mort cellulaire induite par l'amiante et est à l'origine de la transformation cancéreuse^{16,451,452}.

Ensuite, les gradients d'oxygène et de nutriments, la nécrose des cellules et l'environnement inflammatoire induisent la formation d'une matrice extracellulaire de type fibrotique au sein de nos sphéroïdes. En effet, il a été démontré que le manque d'oxygène et l'échauffement du microenvironnement conduisent directement à la production de protéines matricielles caractéristiques du tissu cicatriciel^{453–455}. Les principaux composants de la matrice extracellulaire fibrotique observés dans les sphéroïdes sont par ailleurs particulièrement spécifiques de ceux trouvés dans le MPM. Nous avons en effet observé une augmentation de l'expression des gènes codant pour les protéines composant la matrice extracellulaire telles que *COL1A1*, *COL4A2*, *COL6A1* et *COL6A2*, mais aussi *TNC* et *FN1*. Nous avons confirmé la présence de ces protéines dans nos sphéroïdes grâce à la microscopie confocale. Ainsi, l'analyse SHG (*Second harmonic generation*) par microscopie confocale biphotonique met en évidence la présence de fibres de collagène denses au cœur du sphéroïde. Le mésothélium normal de la plèvre est une unique couche de cellules mésothéliales reposant sur une membrane basale continue. Les collagènes, et en particulier les collagènes de type I, II et IV, ont été décrits comme les constituants majeurs du tissu conjonctif pleural normal. Dans les tissus du MPM le collagène de type I reste prépondérant. Même si on constate une augmentation de la production de collagène de type IV par les cellules tumorales, il semblerait en effet que la majorité des constituants de la matrice soient conservés dans des proportions similaires au tissu normal, mais dans un état déstructuré, au service de l'expansion tumorale⁴⁵⁶.

J'ai ensuite montré que la FN1 forme un réseau dense et homogène dans l'ensemble du sphéroïde tandis que la TNC est présente en fibres lâches, essentiellement en périphérie et dans les couches intermédiaires. Cette organisation se rapproche fortement de celle retrouvée dans les tumeurs mésothéliales. Tout d'abord, la FN1 et la TNC sont considérées comme des marqueurs histologiques du MPM⁴⁵⁷. Ainsi, les cellules mésothéliales malignes ont la capacité de rassembler la fibronectine en réseaux fibrillaires relativement homogènes de matrice organisée, situés principalement entre les cellules⁴⁵⁷. De même, une analyse immunohistochimique de 37 échantillons de MPM a pu révéler que la ténascine-C était

exprimée dans le stroma de tous les sous-types histologiques de MPM et principalement au niveau de la frontière invasive⁴⁵⁸.

De plus, notre analyse transcriptomique met en évidence l'expression de gènes codant pour des protéines de liaison et de communication entre la cellule et la matrice. Parmi eux sont retrouvés *CD44* et *CD47* ou différentes intégrines comme *ITGA1*, *ITGA2* et *ITGB8*. La littérature nous indique que les constituants secondaires de la matrice du MPM sont également généralement conservés dans des proportions similaires à celles du tissu sain. C'est essentiellement la désorganisation du tissu mésothélial qui caractérise l'ECM du MPM avec principalement l'expansion anarchique de la membrane basale⁴⁵⁶. Se rapprochant de la réalité tumorale, notre analyse indique une surexpression de nombreux gènes codant pour des protéines de la lame basale comme *LAMB3* et *LAMC2*.

Enfin, l'analyse transcriptomique des sphéroïdes de MPM a révélé une diminution générale de l'expression des gènes codant pour les protéines de la division cellulaire telles que les cyclines et les kinases dépendantes des cyclines dans trois des quatre lignées analysées. Nous avons confirmé un ralentissement significatif de la prolifération cellulaire pour au moins 5 des lignées étudiées grâce à l'analyse des différentes phases du cycle cellulaire en 2D et en 3D. Les cellules en prolifération sont principalement localisées dans la couche externe de la culture 3D, comme le montre l'expression de la protéine de prolifération Ki67.

Par ailleurs, nous avons observé une dérégulation à la baisse de l'expression de plusieurs voies métaboliques, telles que le métabolisme du pyruvate et des acides aminés, lorsque les lignées cellulaires de MPM sont cultivées en sphéroïdes. Nous prévoyons de confirmer ces modifications métaboliques par des marquages de l'activité mitochondriale et de la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), une enzyme témoignant de l'activité glycolytique des cellules. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent l'établissement d'une dormance cellulaire dans les couches intermédiaires des sphéroïdes. Cet état, principalement défini par un arrêt du cycle cellulaire, est induit par des conditions que nous retrouvons dans nos sphéroïdes. En effet, lorsque les conditions de stress environnementaux ou thérapeutiques deviennent trop intenses, les cellules tumorales ont la capacité de modifier leur état métabolique pour se mettre en dormance. Les cellules cancéreuses dormantes prolifèrent moins vite ou pas du tout, présentant des propriétés de cellules

souches et/ou de sénescence³⁴⁰. Nous retrouvons par ailleurs une dérégulation dans l'expression des gènes de la voie de la sénescence dans nos sphéroïdes. La présence de cellules en dormance a été attestée dans de nombreux cancers^{292,459}. En particulier, différentes études ont montré que l'hypoxie au sein de sphéroïdes de MPM est responsable de la mise en dormance des cellules tumorales et associée à une résistance à la chimiothérapie^{341,342}. Les cellules dormantes ont par ailleurs été indiquées comme potentiellement responsables de la repopulation tumorale après chimioradiation dans des modèles de MPM murin⁴⁶⁰.

B. Les sphéroïdes de MPM sont peu permissifs à la réplication du MV de façon indépendante de la réponse IFN de type I

Les modèles cellulaires 3D sont également utilisés pour étudier les interactions entre les virus et leurs hôtes⁴⁶¹. De la même façon que pour l'étude des tumeurs, ces modèles permettent de recréer l'environnement cellulaire complexe dans lequel se produisent ces interactions. Ils offrent ainsi une alternative plus réaliste aux cultures cellulaires en deux dimensions. Les modèles de culture cellulaire en 3 dimensions sont ainsi de plus en plus utilisés pour étudier les mécanismes d'infection, de propagation, la réponse immunitaire et la pathogenèse virale, mais également les capacités oncolytiques des virus⁴⁶². En effet, plus d'une centaine de virus oncolytiques ont fait l'objet d'essais cliniques suite aux résultats prometteurs obtenus *in vitro* dans des modèles précliniques classiques. Néanmoins dans la plupart des cas leur efficacité a été modeste et très peu ont été approuvés pour une utilisation clinique⁴⁶³. Cela suggère que certains facteurs clés déterminant la réussite ou l'échec des traitements ne peuvent être étudiés que dans des modèles *in vitro* plus complexes et humains.

Dans ce contexte, j'ai étudié les différences de capacités oncolytiques du MV entre un modèle de culture classique de lignées cellulaires humaines de MPM et notre modèle de sphéroïdes. L'équipe avait précédemment mis en évidence dans un modèle de culture classique que la majorité des lignées cellulaires tumorales de MPM utilisées dans nos études sont sensibles à l'activité oncolytique du MV parce qu'elles présentent des défauts de la voie antivirale IFN de type I. Le principal défaut retrouvé est la délétion homozygote des gènes codant pour les IFN I^{22,276,442}.

Tout d'abord, mes travaux de thèse ont montré que les mêmes lignées cellulaires cultivées sous forme de sphéroïdes sont peu permissives à la réplication du MV. En effet, j'ai pu mettre en évidence une absence de réplication virale dans la majorité des lignées testées (6/8) et une baisse significative des capacités répliquatives pour une des deux lignées restant sensibles. De plus, la réplication virale dans les deux lignées sensibles en 3D reste en surface des sphéroïdes. En effet, le MV ne semble pas pénétrer dans les couches intermédiaires et profondes des sphéroïdes.

Ensuite, j'ai montré que cette résistance n'est pas due à la réponse IFN I. Effectivement, la réplication virale n'a pas pu être améliorée par l'utilisation d'un inhibiteur de la signalisation du récepteur aux IFN I, le ruxolitinib. Par ailleurs, des lignées ne possédant plus les gènes codant pour les IFN de type I sont également résistantes en 3D.

Enfin, l'analyse de l'étude transcriptomique montre une absence de gènes différentiellement exprimés lors de l'infection de nos sphéroïdes de MPM pour les deux lignées totalement résistantes. Ceci confirme tout d'abord la résistance des lignées de MPM au MV en 3D. Cela suggère ensuite que des facteurs de restriction viraux ne sont pas activés par l'infection mais sont présents avant celle-ci. Cette hypothèse est renforcée par la démonstration de l'acquisition progressive des capacités de résistance au MV observée en microscopie. Dans l'ensemble, ces résultats montrent que nos lignées cellulaires cultivées sous forme de sphéroïdes subissent une transformation phénotypique leur conférant une résistance intrinsèque au MV oncolytique indépendante de la réponse IFN de type I. De plus, j'ai vérifié que des gènes décrits comme nécessaires à la réplication du MV étaient bien exprimés en 3D⁴⁶⁴. En effet, DE Anderson *et al* ont identifié par la technique CrisprCAS9 une liste de gènes indispensables à la réplication du MV. Ces gènes sont exprimés de façon identique dans les 4 lignées de MPM qu'elles soient cultivées en 2D ou 3D.

Les difficultés d'infection, de réplication et de propagation des virus oncolytiques indépendantes de la réponse antivirale ont été montrées dans de nombreuses études sur les modèles 3D et les tumeurs. Notamment, une étude mathématique modélisant la diffusion d'un virus répliquatif dans une tumeur en fonction du point d'infection suggère un "optimisme prudent" vis à vis de cette thérapie⁴⁶⁵. Cette étude, comme d'autres⁴⁶⁶, recommande l'injection de doses massives et en plusieurs sites pour avoir une efficacité de diffusion. Ces prédictions sont confortées par plusieurs études

cliniques et précliniques qui ont effectivement montré que la dissémination virale est souvent limitée au strict site d'injection⁴⁶⁷⁻⁴⁶⁹. D'autres études mettent néanmoins en évidence des résultats contradictoires concernant les capacités oncolytiques des virus dans les modèles en 3 dimensions. Ainsi, certains virus comme le HSV-1, les adénovirus ou le cytomégalovirus, montrent une capacité de réplication accrue dans certains modèles de sphéroïdes⁴⁷⁰. Dans le même esprit de contradiction, un virus Sindbis a montré une pénétration et une oncolyse totales dans des sphéroïdes alors que dans le même modèle un réovirus a montré une activité oncolytique uniquement en surface⁴⁴⁴. De même, un Myxomavirus et un VV oncolytiques démontrent des capacités d'infection, de réplication et de lyse tumorale très inférieures en 3D. Mais dans la même étude, un virus de Maraba conserve à l'inverse des capacités oncolytiques prometteuses en sphéroïdes³⁴⁴.

Face aux résultats contradictoires de la littérature, j'ai testé dans des expériences non présentées dans ce manuscrit les capacités d'autres virus oncolytiques. Le VSV, le VV TK- RR- et le Myxomavirus sont des virus plus ou moins sensibles à la réponse IFN I et dont les modes de propagation diffèrent. Aucun de ces virus n'a réussi à se répliquer dans les cultures en 3D de nos lignées de MPM, même en présence de ruxolitinib, alors que les cellules cultivées en 2D sont sensibles. J'ai en revanche pu montrer que des lignées tumorales issues d'adénocarcinomes pulmonaires cultivées selon la même méthode ne présentent pas de résistance accrue au MV en 3D. Ces éléments mettent en lumière que ce n'est pas la structure physique générale des sphéroïdes qui génère la mise en place de la résistance mais bien les particularités de chaque cancer et d'association entre les caractéristiques d'un OV et celles des cellules tumorales.

C. La dormance des cellules tumorales en sphéroïdes limite les capacités oncolytiques du MV

1. La dormance

Nous avons montré que la culture de nos lignées de MPM en sphéroïdes induit la mise en dormance des cellules tumorales. Ce phénomène, couramment montré dans les modèles 3D, est associé à la résistance aux virus oncolytiques^{471,472}. En modulant la prolifération et l'activité des cellules, nous influençons fortement la

capacité de réplication du MV dans les sphéroïdes et dans les cultures en monocouche. Notamment, la levée de la dormance des cellules de Meso13 en sphéroïde par ajout d'EGF dans le milieu de culture permet de restaurer une bonne réplication virale, avec une pénétration de l'infection dans les couches intermédiaires des structures 3D. En effet, la dormance des cellules tumorales implique un état métabolique et des voies de signalisation qui sont particulièrement défavorables à la réplication virale²⁹².

Le ralentissement de la prolifération en dormance est associé à une reprogrammation métabolique incompatible avec la réplication virale^{343,473}. En effet, la plupart des virus et des OVés ont une grande dépendance vis-à-vis des voies métaboliques de la cellule. Notamment, il a été démontré que certaines enzymes de la glycolyse sont directement impliquées dans les étapes de réplication des paramyxovirus³²¹. De la même façon, la présence de certains acides aminés, notamment l'arginine, l'isoleucine et la réonine, est essentielle pour une réplication correcte du MV³²². L'analyse transcriptomique de nos sphéroïdes a révélé une régulation à la baisse des gènes impliqués dans les voies de la glycolyse et de la production d'acides aminés. Le bouleversement des activités métaboliques cellulaires induit par la mise en dormance des cellules tumorales pourrait donc être à l'origine de la diminution de la réplication virale dans les sphéroïdes.

La dormance implique également la mise en place d'autres processus cellulaires impactant la réplication virale. Notamment, l'autophagie, qui contribue à la survie des cellules tumorales dormantes³⁴⁶, est également considérée comme un mécanisme de défense innée contre les infections virales^{347,474}. Néanmoins pour certains virus, notamment le MV, le rôle de l'autophagie est controversé³⁵². Dans le cas du MPM, plusieurs études ont montré que l'autophagie est souvent activée dans les cellules tumorales en réponse au stress métabolique³⁵³. Notamment, le traitement par cisplatine du MPM induit une augmentation de l'expression de la sous-unité régulatrice 15A de la protéine phosphatase 1 (GADD34 : *protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A*) qui potentialise l'action oncolytique d'un HSV-1⁴⁷⁵. Cette protéine joue un rôle clef dans les processus d'autophagie⁴⁷⁶.

Dans notre modèle de sphéroïdes, les résultats des analyses transcriptomiques ne révèlent pas de changement significatif de la voie de l'autophagie. Cependant il s'agit d'une voie principalement régulée par des mécanismes post-traductionnels. Par

ailleurs, certains gènes de cette voie sont tout de même significativement dérégulés (*GABARAP*, *GABARAPL2*, *ATG4A*), et on observe une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'activité lysosomale. Il est donc possible que l'autophagie induite par la dormance des cellules tumorales cultivées en sphéroïdes impacte la réplication du MV. L'utilisation d'inhibiteurs tels que le 3-Méthyladenine (3-MA) ou la chloroquine, associés à des marquages de la protéine associée aux microtubules 1A/1B chaîne légère 3B (LC3b : *microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B*) et de la protéine p62, pourrait nous permettre d'élucider le rôle de ce processus notre le modèle.

2. Influence de l'EGF sur la réplication virale

La fixation d'un ligand sur l'EGFR entraîne l'activation d'un ensemble remarquable et complexe de voies de transduction. L'un des rôles clef de la signalisation de l'EGFR est l'induction de la production de la cycline D1, formant un complexe avec CDK4/6 initiant la progression du cycle cellulaire²⁹⁸. J'ai pu montrer que l'ajout d'EGF dans le milieu de culture des sphéroïdes de la lignée de MPM Meso13 permet de restaurer une bonne réplication virale, avec une pénétration de l'infection dans les couches intermédiaires des structures 3D. Cette restauration est corrélée avec la reprise du cycle cellulaire et une augmentation de la prolifération. De ce fait, nous supposons que c'est à travers un mécanisme de levée de dormance que l'EGF parvient à rétablir la sensibilité des cellules au MV. Le séquençage de sphéroïdes de Meso13 traités à l'EGF pourrait nous permettre de confirmer cette hypothèse.

En effet, l'EGF est un facteur pléiotropique. La signalisation EGFR peut donc potentialiser une infection virale de nombreuses façons. Certains virus ont par ailleurs évolué pour exploiter cette signalisation. Par exemple l'EGFR peut servir de co-récepteur d'entrée au cytomégalovirus humain (HCMV) et au virus associé aux adénovirus de sérotype 6 (AAV6 : *adeno associated virus 6*)³¹².

Ensuite, certains virus comme le HSV-1 et l'EBV exploitent la signalisation EGFR pour son rôle dans le remodelage du cytosquelette, facilitant leur pénétration dans les cellules hôtes par perturbation du réseau d'actine sous-membranaire (cortex)⁴⁷⁷. L'usurpation de la signalisation de l'EGFR permet également à d'autres virus de contrer les réponses antivirales de l'hôte. Par exemple, l'activation de la

signalisation EGFR par le virus de la grippe A (IAV : *influenza A virus*) et rhinovirus (RV) réduit la production d'IFN de type III en supprimant le facteur IRF-1, améliorant le titre viral^{478,479}.

Enfin, la translocation mitochondriale de l'EGFR, régulant la dynamique mitochondriale, peut jouer un rôle métabolique favorable à la réplication virale³⁰⁰. Cela pourrait aussi expliquer l'amélioration de la réplication virale dans notre modèle. Notons également que l'activité des mitochondries est étroitement liée aux défenses antivirales. L'activation des PRRs lors d'une infection induit des modifications de la dynamique mitochondriale permettant la mise en place des défenses antivirales⁴⁸⁰. Notamment, le stress métabolique ou les infections virales induisent des phénomènes d'hyperfusions mitochondriales. Ces hyperfusions provoquent la libération de l'ADN mitochondrial dans le cytosol ce qui induit l'activation de voies antivirales par la voie cGAS/STING^{337,481}.

D. Autres facteurs de restriction aux OV dans les sphéroïdes de MPM

1. Les récepteurs viraux

Afin de caractériser la nature des facteurs de résistance au MV des sphéroïdes de MPM, je me suis intéressée à l'expression des récepteurs du MV sur les cellules. En effet, l'entrée des particules virales du MV dans les cellules tumorales est dépendante des récepteurs membranaires CD46, CD150 et Nectine-4 dont l'expression peut varier en fonction des conditions de culture¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. La baisse d'expression de récepteurs viraux a précédemment été décrite dans des sphéroïdes de cancer de l'ovaire où elle était responsable de la diminution de l'activité oncolytique du virus de Maraba et du VSV³⁴⁴. Dans notre modèle, j'ai tout d'abord confirmé que nos lignées de MPM n'expriment que le CD46 et pas le CD150 et la nectine 4 en 2D et en 3D²⁷⁶.

Ensuite, j'ai montré que la diminution de l'expression du CD46 n'explique pas entièrement la diminution de réplication du MV dans les sphéroïdes. En effet, il a été montré que l'infection était proportionnelle à la densité de récepteurs à la surface des cellules mais qu'une faible densité était suffisante pour permettre une infection par le virus^{194,276}. De plus, le niveau d'expression obtenu en 3D pour certaines lignées cellulaires résistantes était similaire au niveau d'expression d'autres lignées cellulaires

sensibles en 2D. Enfin, le CD46 est uniformément exprimé dans les couches sphéroïdes, n'expliquant pas l'incapacité du MV à se répliquer en profondeur.

2. La matrice extracellulaire

La présence d'une matrice extracellulaire dense pourrait gêner la pénétration des particules virales au sein des sphéroïdes. En effet, de nombreuses études précliniques ont démontré que les perturbations structurelles des matrices extracellulaires tumorales peuvent constituer de véritables barrières physiques à la diffusion des OV^s⁴⁸². Par exemple, le sulfate d'héparine et le collagène de la matrice extracellulaire limitent la propagation du NDV dans des cultures d'explants de mélanome³⁹⁶. Il est important de noter que l'étude de l'impact des protéines matricielles dans un modèle de sphéroïde est délicate car l'utilisation d'inhibiteurs ou d'enzymes permettant la dégradation de ces protéines bouleverse profondément la structure des modèles 3D. Lors de ma thèse, j'ai pu montrer que la matrice extracellulaire des sphéroïdes ne semble pas être le principal facteur responsable de la baisse de capacités oncolytiques du MV.

Tout d'abord, l'analyse SHG met en évidence la présence de fibres de collagène denses au cœur des sphéroïdes. Nous supposons que leur présence peut entraver la pénétration des particules virales dans les couches profondes. Cependant, cela n'explique pas l'absence de réplication virale dans les couches intermédiaires de la structure, dépourvues de collagène.

Ensuite, le virus de la rougeole se propageant essentiellement par contact cellulaire³⁹⁷, le réseau dense de FN1 mis en évidence par microscopie confocale pourrait bloquer l'établissement de synapses infectieuses. Cependant, il a été montré que les particules virales de MV sont capables de se fixer à la fibronectine⁴⁸³. Dans notre modèle, dépourvu de microenvironnement cellulaire, il apparaît que la liaison de la fibronectine aux cellules via les intégrines membranaires peut faciliter l'interaction cellule-particule. En effet, il a été montré que les particules retenues par les fibres peuvent « glisser » le long de celles-ci jusqu'aux cellules, facilitant l'infection de différents types de virus⁴⁸⁴⁻⁴⁸⁶. Par ailleurs, le réseau de fibronectine est particulièrement homogène dans nos sphéroïdes, n'expliquant pas le différentiel de réplication entre les différentes couches cellulaires.

Enfin, la localisation périphérique et médiane des fibres lâches de TNC pourrait suggérer que leur présence facilite plutôt l'infection. En effet, cette protéine matricielle est récemment apparue comme un biomarqueur de la gravité de différentes pathologies virales, comme celles induites par le virus de la grippe, le SARS-CoV-2 et le HIV-1⁴⁸⁷.

3. Les voies inflammatoires

Les résultats de l'analyse transcriptomique des sphéroïdes ont mis en évidence l'activation de voies inflammatoires telles que celles du TNF- α , NF- κ B et IL-17. Ces voies sont fréquemment activées lors d'une infection et pourraient placer le tissu tumoral dans un état antiviral basal⁴⁸⁸. Néanmoins, nous estimons qu'il est peu probable que ces voies soient impliquées directement dans la résistance au MV dans le contexte de nos sphéroïdes. En effet, les actions antivirales des protéines inflammatoires retrouvées sont essentiellement secondaires. Les voies inflammatoires régulées à la hausse agissent principalement par stimulation des populations immunitaires ou en activant la réponse antivirale IFN de type I⁴⁸⁹. Nous n'avons pas observé d'induction de l'expression des gènes codant pour les IFN de type I tels que *IFNB1* ou *IFNA2* dans les lignées cellulaires Meso4 et Meso34 cultivées en 3D bien qu'elles possèdent encore les deux copies de ces gènes. Nous n'avons pas non plus constaté l'augmentation de l'expression des gènes codant pour des ISGs. L'inflammation présente dans les sphéroïdes ne paraît donc pas pré-activer les défenses antivirales des cellules tumorales. Nous prévoyons de confirmer cette hypothèse par inhibition des voies de l'inflammasome et NF- κ B par la molécule Bay11-7082, ou de la voie antivirale cGAS/STING par la molécule H-151.

E. Perspectives

1. Le modèle de culture

Dans un premier temps mes travaux de thèse ont montré que la culture en sphéroïdes est un modèle approprié pour l'étude du comportement des cellules de MPM *in vitro*. En effet, nos cellules ainsi cultivées présentent des caractéristiques particulièrement pertinentes vis à vis de la réalité biologique de ce cancer, notamment la mise en place d'un microenvironnement inflammatoire générant des interactions

matricielles proches de celles décrites dans les tumeurs *in vivo*. Ces résultats montrent dans l'ensemble que nos sphéroïdes de MPM peuvent être utilisés pour étudier les mécanismes de résistance aux traitements et pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

La fidélité de ce modèle au MPM, validée par mes travaux de thèse, permet par ailleurs leur utilisation pour des études plus approfondies sur les OV. J'ai eu l'occasion de complexifier ce modèle par ajout de cellules caractéristiques du microenvironnement du MPM, comme les macrophages. Des résultats préliminaires montrant le rôle inhibiteur de leur production IFN de type I sur la réplication du MV ont permis d'initier une nouvelle étude. Ces travaux, en cours de réalisation, permettront de caractériser d'avantage la mise en place de la résistance au MV induite par les macrophages, ainsi que l'impact du MV sur le phénotype de ces cellules (Châtelain C et al, en préparation).

Dans un second temps, les phénomènes de dormance mis en évidence, responsables notamment de la résistance au MV oncolytique, doivent être pris en compte. En effet, ces mécanismes de survie ont couramment été décrits dans ce mode de culture cellulaire, qui n'est donc pas toujours adapté pour des études de longue durée⁴²². La remise en culture des sphéroïdes dans une matrice ou dans un système de flux, que nous développons dans notre laboratoire, pourrait permettre de prolonger l'utilisation des cellules avant l'apparition d'une nécrose ou d'une dormance tumorale.

Néanmoins, la présence de cellules en dormance ou de cellules à phénotypes souches se divisant peu a été attestée dans de nombreux cancers, dont le MPM^{292,459}. Dans ce contexte, notre modèle de culture permet d'étudier leur responsabilité dans la résistance aux traitements anticancéreux et les phénomènes de rechutes⁴⁶⁰. D'autres études que la nôtre utilisent déjà les modèles 3D avec des cellules en dormance pour étudier la résistance aux OV⁴⁹⁰.

2. Implications thérapeutiques de la dormance tumorale pour les OV

Afin d'induire la sortie de dormance de nos lignées, nous avons utilisé différents facteurs mitogènes tels que le facteur de croissance transformant bêta 3 (TGF β 3 : *transforming growth factor 3*) ou le FGF2. Mais seul l'EGF a été capable de faire repartir la prolifération cellulaire. En effet, l'EGFR est surexprimé dans plus de 50% des cas de MPM⁴⁹¹. L'autophosphorylation de ce récepteur induit une activation constitutive de la voie entraînant une forte croissance cellulaire^{29,30}. Néanmoins, nous avons été étonnés de constater que seules les deux lignées demeurées sensibles au MV (Meso13 et Meso34) sont capables de répondre à l'EGF. Il serait donc intéressant de vérifier si les lignées présentent des mutations de la voie EGFR ou une surexpression de ce récepteur. Dans ce contexte, la surexpression et l'activation constitutive de l'EGFR pourrait constituer un marqueur prédictif de réponse au MV oncolytique. D'ailleurs, certaines études en cours cherchent à sensibiliser les cellules tumorales aux OV grâce à des composés tels que l'orthovanadate de sodium (vanadate) qui ont pour effet de déclencher la signalisation EGFR⁴⁹². Cette étude met en évidence l'importance des associations thérapeutiques. Ils montrent notamment que le blocage pharmacologique de l'EGFR, une thérapie actuellement évaluée dans de MPM⁴⁹¹, peut contrecarrer les bénéfices de la thérapie combinée vanadium/OVs.

Les résistances des cellules dormantes ou à phénotype souche aux OV posent également la question des modes d'administration. Le bénéfice clinique de l'administration par voie intratumorale (IT) des virus oncolytiques a largement été démontré, notamment grâce à l'essai clinique de phase III évaluant le T-VEC pour le traitement du mélanome⁴⁹³. Cette voie est largement utilisée car elle présente de nombreux avantages. Tout d'abord, elle permet de contourner directement les obstacles auxquels les OV pourraient faire face, notamment la pré-immunisation. Elle permet ensuite une concentration et un contrôle optimaux de la dose de virus arrivant à la tumeur⁴⁹⁴. Néanmoins, les modalités de l'injection en IT influencent fortement la capacité du virus à correctement se répliquer au sein d'une tumeur. De nombreuses études mettent notamment en évidence que les multiples injections sont plus efficaces, augmentant les chances d'obtenir une propagation virale⁴⁴⁵.

Notre étude montre que les cellules en dormance font de mauvaises cibles pour la réplication du MV. Dans ce cadre, une administration par voie intraveineuse (IV)

pourrait permettre d'atteindre essentiellement les cellules actives métaboliquement tandis qu'une simple injection IT ne garantit pas que le virus se retrouve dans un environnement favorable à sa réplication.

3. Implications thérapeutiques des autres facteurs de résistance

Mes travaux de thèse ont également mis en évidence une augmentation de l'expression des gènes inflammatoires et la présence d'une matrice extracellulaire de type fibrotique lorsque nos cellules sont cultivées sous forme de sphéroïdes. Bien que ces phénomènes ne semblent pas être la cause directe de la baisse d'efficacité oncolytique du MV dans notre modèle, leur apparition dans un contexte tumoral peut fortement impacter l'efficacité d'une thérapie par OV. En effet, l'inflammation chronique du MPM générée par la présence de fibres d'amiante induit le recrutement de cellules immunitaires dont les fonctions sont détournées aux profils de la croissance tumorale¹⁶. Ces cellules ont bien souvent des activités antivirales fonctionnelles et leur présence dans le microenvironnement pourrait donc protéger le tissu tumoral de l'infection virale⁴⁹⁵.

De la même façon, si dans notre modèle la présence, la localisation et l'orientation des fibres matricielles ne semblent pas être responsables de la diminution des capacités oncolytiques du MV, ces protéines sont également particulièrement représentées dans le MPM. Dans un véritable contexte tumoral, comprenant un microenvironnement cellulaire, leur présence peut avoir un véritable impact sur la diffusion des particules virales. Par exemple, la fixation à la FN1 du MV limite l'infection dans les tissus par activation de la cascade du complément, facilitant notamment la phagocytose des particules virales par les cellules immunitaires⁴⁸³. Face à cette barrière physique, l'armement d'OVs à l'aide de métallo-protéases matricielles, une famille d'enzymes permettant la dégradation des composants de l'ECM, a largement été testé, mais a démontré des résultats très inégaux selon l'OV utilisé, le type de MMP ou le type de cancer^{482,496,497}.

De plus, la production de collagène et son assemblage sont fortement régulés par diverses enzymes telles que les lysyl-oxydases (LOX/LOXL)⁴⁹⁸. Il a été montré que de nombreuses tumeurs solides dont le MPM expriment de manière aberrante la famille des lysyl-oxydases⁴⁹⁹. Ces enzymes sont notamment responsables de la réticulation des fibres matricielles sous une forme fibrosée associée à un mauvais

pronostic⁵⁰⁰. Il a été montré que l'administration d'inhibiteurs de Pan-LOX ou de LOXL2 supprime l'expression des protéines matricielles COL1A et FN1, ainsi que de certaines métalloprotéases (MMP2 et 9) et marqueurs inflammatoires (TNF α et MCP-1). L'utilisation de ce genre d'inhibiteurs en complément des OV pourrait potentialiser leur pénétration et leur propagation dans les tumeurs. Toutefois, d'autres études dans le MPM impliquent la dégradation du collagène, de l'acide hyaluronique et des héparanes sulfates dans la progression du cancer et les métastases⁵⁰¹. L'ECM possède effectivement un rôle immunitaire non négligeable. Ainsi, l'enrichissement en acide hyaluronique de la matrice permet par exemple l'accrochage des monocytes et des lymphocytes dans les tumeurs⁵⁰².

Pour conclure, il est en effet important de rappeler que la cause principale de la réussite d'un traitement par OV est la mise en place d'une réponse immunitaire contre la tumeur⁷⁷. Dans ce cadre, il apparaît que les OV n'ont pas forcément besoin de se répliquer dans la totalité des cellules pour induire une réponse thérapeutique efficace. En effet, des travaux récents suggèrent qu'une infection même limitée des métastases ganglionnaires éloignées peut conduire à un bénéfice thérapeutique accru⁵⁰³. En somme, même si des recherches supplémentaires sont nécessaires pour optimiser leur utilisation et maximiser leur efficacité, les virus oncolytiques représentent une piste prometteuse dans le traitement du cancer.

Le virus oncolytique atténué de la rougeole codant pour NY-ESO-1 induit la présentation HLA I et II de cet antigène tumoral par le mélanome et les cellules dendritiques.

La virothérapie oncolytique est une stratégie de ciblage du micro-environnement induisant la mort immunogène des cellules tumorales, pouvant initier ou renforcer la réponse immunitaire anti-tumorale. En effet, la libération de signaux de dangers viraux et cellulaires, et d'antigènes de tumeurs lors de la lyse des cellules tumorales favorise la présentation antigénique par les DCs et l'initiation de réponses T anti-tumorales⁵⁰⁴. Le Dr Frédéric Tangy a créé le virus MVny afin d'augmenter le niveau de présentation HLA global de l'antigène de tumeur NY-ESO-1 par les cellules tumorales et les DCs dans le but de stimuler les lymphocytes T spécifiques.

Les travaux de Mohamed Idjellidaine ont mis en évidence que le MVny permet l'expression de fortes quantités de NY-ESO-1 dans les cellules tumorales, provoquant leur reconnaissance par des lymphocytes T CD4+ et CD8+ spécifiques de cet antigène. J'ai pris la suite de cette étude lors de mon stage de master 2. Mon objectif était de caractériser les effets du MVny sur les DCs et de déterminer si ce virus est capable d'induire une présentation importante de NY-ESO-1 par ces cellules, entraînant l'activation de LT CD4+ et CD8+ spécifiques de cet antigène.

Nos résultats indiquent tout d'abord que les DCs sont rapidement infectées par le MV non modifié comme par le MVny, provoquant la formation de syncytiums, effet cytopathique caractéristique du virus. Sous 36h, une première vague d'infection par le MV GFP provoque une fluorescence aussi intense que celle retrouvée pour la lignée tumorale de mélanome M88. Cependant, cette fluorescence décroît ensuite progressivement, indiquant que la réplication virale est probablement contenue, tandis qu'elle se poursuit pour les cellules tumorales. En revanche, l'infection est associée chez les DCs à une mortalité importante et significative, qui augmente particulièrement après 48h, comme pour la lignée M88. Ces résultats nous indiquent que l'infection par le MV comme par le MVny provoque la mort des DCs malgré une non propagation de la première vague d'infection virale, contenue après 36h, tandis que dans la lignée

M88 l'infection progresse, provoquant également une mortalité significative. Ceci suggère que les DCs ne sont plus suffisamment nombreuses à pouvoir être infectées par la deuxième vague virale, ou bien qu'elles relarguent des facteurs pro-apoptotiques en réponse à l'infection. Les IFN I peuvent dans certaines conditions bloquer la propagation d'un virus en provoquant l'apoptose des cellules voisines⁵⁰³. Nous posons donc l'hypothèse selon laquelle la réponse IFN I des DCs est bien capable de contenir la réplication du MV comme du MVny après 36h, mais que cette réponse provoque également l'apoptose des DCs environnantes non infectées. Cette hypothèse est appuyée par le fait que la mortalité retrouvée chez les DCs est de nature plus apoptotique que celle retrouvée chez les M88, qui est majoritairement nécrotique. En effet, il a été montré que le MV provoque essentiellement ce type de mort nécrotique, qui est d'ailleurs particulièrement immunogène et participe à l'efficacité de l'immunothérapie oncolytique¹³¹. Il est également important de noter que les DCs matures requièrent habituellement des signaux de survie provenant des interactions avec des cellules environnantes. Il serait donc intéressant de tester également la viabilité des DCs maturées non infectées.

Dans notre étude, nous avons utilisé des DCs obtenues *in vitro* à partir de monocytes sanguins ou monocytes-derived DC (mo-DC), qui sont probablement différentes des populations de DCs effectivement retrouvées dans les mélanomes. Cependant, plusieurs études sur des modèles murins et humains ont montré que les monocytes circulants sont recrutés dans les tumeurs et peuvent se différencier au niveau du site tumoral en mo-DC inflammatoires caractérisées par l'expression du marqueur CD1c^{505,506}. De plus, des cellules CD14 + CD1c +, qui pourraient être de type mo-DC, ont également été observées par histologie dans des lésions cutanées de mélanome⁵⁰⁷. Les mo-DC que nous étudions *in vitro* sont les cellules disponibles les plus proches de ces mo-DC inflammatoires retrouvées dans les tumeurs, même si ces dernières présentent probablement un profil plus immunosuppresseur. Récemment l'équipe a mis en évidence la présence en quantité variable de mo-DC inflammatoires CD1c+ dans les liquides pleuraux de patients souffrant de MPM. Il serait intéressant de confirmer nos résultats sur ce type de Mo-DCs, qui sont un outil précieux même s'ils proviennent d'un autre type de tumeur. D'autres études rapportent également que les DCs plasmacytoïdes (pDC) représentent, avec les cellules de Langerhans, le sous-ensemble de DC le plus fréquent dans les ganglions lymphatiques drainant la

tumeur^{508,509}. Or l'équipe a montré que les pDC présentent une résistance remarquable à l'infection par le MV, similaire à la résistance observée chez les lymphocytes T dans cette étude. En effet, les pDC expriment de façon constitutive des ISG tels que Mxa et IRF7. De plus, elles sont capables d'effectuer une présentation croisée de l'antigène tumoral NYESO-1 à un clone spécifique de lymphocytes T CD8 + quand elles sont cultivées avec des cellules tumorales exprimant naturellement NY-ESO-1 et infectées par le MV¹³¹. Il serait donc intéressant de tester également la sensibilité au MVny des pDC, ainsi que des DC CD1c+ myéloïdes du sang.

Nous avons aussi mis en évidence que le MVny présente une toxicité significativement plus élevée que le MV non modifié, sur les DCs comme sur la lignée M88. La seule différence entre les deux virus étant la présence du gène codant pour la protéine NY-ESO-1, nous pouvons tout d'abord supposer que l'expression de ce gène est à l'origine de la toxicité plus élevée de la souche MVny. Cette hypothèse est appuyée par le fait que le MVny provoque une mortalité plus élevée chez la lignée M88 que chez les DC à 48h, corrélée à une expression plus intense de la protéine NY-ESO-1. Il pourrait être intéressant de transduire des lignées avec un lentivirus exprimant NY-ESO-1. Le lentivirus n'étant pas lytique comme le MV, on pourrait ainsi mettre en évidence la toxicité de NY-ESO-1. D'un autre côté, il se pourrait également que l'allongement plus important du génome par l'inclusion du NY-ESO1 induise la formation d'un plus grand nombre de génomes interférents défectueux non encapsidés. La présence de ces génomes défectueux est corrélée à une plus grande stimulation de la voie IFN- β mais également à une augmentation de la mortalité cellulaire^{281,510}.

Ensuite, nous avons montré que le MVny, comme le MV, est capable d'induire la maturation et l'activation des DCs infectées. En effet, le marqueur de maturation CD83 et les molécules de costimulation CD80 et CD86 sont significativement augmentés en présence des deux types de virus. Nous observons d'ailleurs que le MVny induit une plus forte maturation des DCs, probablement due à une mortalité des DCs et une libération de signaux de dangers plus intenses et plus précoces. Le génome du MV peut aussi être directement détecté par les DCs. En effet, l'équipe a montré que les hélicases cytoplasmiques RIG-1 et/ou MDA5 permettent la détection du MV dans les DC CD1c+^{131,504}. Cependant, l'augmentation de ces marqueurs n'indique pas nécessairement que des DCs sont aptes à présenter un antigène à un lymphocyte

dans un contexte activateur. Il aurait donc été intéressant de regarder d'autres marqueurs de maturation informatifs de la capacité fonctionnelle des DCs activées, comme la production d'IL-12, nécessaire à l'orientation de la réponse adaptative vers un profil Th1 favorable à la réponse T cytotoxique, ou encore l'expression du récepteur CCR7, indiquant que les DCs sont bien capables de migrer vers les ganglions. Néanmoins, les niveaux d'activation intenses des cellules T CD4+ et CD8+ spécifiques de NY-ESO-1 observés lors de co-cultures avec des DC infectées par le MVny montrent que ces DCs sont bien capables de présenter fortement l'antigène via les molécules HLA de classe I et de classe II.

En conclusion, la virothérapie oncolytique est une approche prometteuse pour le traitement des cancers. Cependant, il est toutefois nécessaire de mieux comprendre les interactions des virus oncolytiques, non seulement avec les cellules tumorales, mais aussi avec leur micro-environnement. L'étude de l'activité oncolytique du MV dans des modèles de sphéroïdes contenant ou non des cellules saines que j'ai mise en place lors de ma thèse permettra certainement de mieux comprendre et d'améliorer le potentiel oncolytique de ce virus. Il est aussi envisageable de modifier le MV pour le rendre plus efficace. J'ai démontré qu'un MV modifié pour exprimer l'antigène de tumeur NY-ESO-1 est capable d'induire la maturation des DCs et leur capacité à présenter directement cet antigène à des lymphocytes T CD4+ et CD8+. Il serait maintenant intéressant de déterminer si les DCs infectées par le MVny sont capables d'activer des lymphocytes T naïfs. J'ai énormément aimé travailler sur ces différents sujets, particulièrement passionnants du fait de leur pluridisciplinarité. Cette approche, est en plein essor actuellement, pourrait offrir des solutions thérapeutiques à des milliers de patients.



REFERENCES

1. Røe, O. D. & Stella, G. M. Malignant pleural mesothelioma: history, controversy and future of a manmade epidemic. *Eur. Respir. Rev. Off. J. Eur. Respir. Soc.* **24**, 115–131 (2015).
2. Yap, T. A., Aerts, J. G., Popat, S. & Fennell, D. A. Novel insights into mesothelioma biology and implications for therapy. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 475–488 (2017).
3. Scherpereel, A. *et al.* ERS/ESTS/EACTS/ESTRO guidelines for the management of malignant pleural mesothelioma. *Eur. Respir. J.* **55**, (2020).
4. Patel, S. C. & Dowell, J. E. Modern management of malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer Targets Ther.* **7**, 63–72 (2016).
5. Marinaccio, A. *et al.* The epidemiology of malignant mesothelioma in women: gender differences and modalities of asbestos exposure. *Occup. Environ. Med.* **75**, 254–262 (2018).
6. Alpert, N., van Gerwen, M. & Taioli, E. Epidemiology of mesothelioma in the 21st century in Europe and the United States, 40 years after restricted/banned asbestos use. *Transl. Lung Cancer Res.* **9**, S28–S38 (2020).
7. Robinson, B. M. Malignant pleural mesothelioma: an epidemiological perspective. *Ann. Cardiothorac. Surg.* **1**, 491–496 (2012).
8. Brims, F. Epidemiology and Clinical Aspects of Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancers* **13**, 4194 (2021).
9. Carbone, M., Kratzke, R. A. & Testa, J. R. The pathogenesis of mesothelioma. *Semin. Oncol.* **29**, 2–17 (2002).
10. Attanoos, R. L., Churg, A., Galateau-Salle, F., Gibbs, A. R. & Roggli, V. L. Malignant Mesothelioma and Its Non-Asbestos Causes. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **142**, 753–760 (2018).

11. Sakamoto, Y. *et al.* Induction of mesothelioma by a single intrascrotal administration of multi-wall carbon nanotube in intact male Fischer 344 rats. *J. Toxicol. Sci.* **34**, 65–76 (2009).
12. Hillerdal, G. & Berg, J. Malignant mesothelioma secondary to chronic inflammation and old scars. Two new cases and review of the literature. *Cancer* **55**, 1968–1972 (1985).
13. Chang, E. T., Lau, E. C., Mowat, F. S. & Teta, M. J. Therapeutic radiation for lymphoma and risk of second primary malignant mesothelioma. *Cancer Causes Control CCC* **28**, 971–979 (2017).
14. Bocchetta, M. *et al.* The SV40 large T antigen-p53 complexes bind and activate the insulin-like growth factor-I promoter stimulating cell growth. *Cancer Res.* **68**, 1022–1029 (2008).
15. Risberg, B., Nickels, J. & Wågermark, J. Familial clustering of malignant mesothelioma. *Cancer* **45**, 2422–2427 (1980).
16. Yang, H. *et al.* Programmed necrosis induced by asbestos in human mesothelial cells causes high-mobility group box 1 protein release and resultant inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 12611–12616 (2010).
17. Dubois, F. *et al.* Molecular Alterations in Malignant Pleural Mesothelioma: A Hope for Effective Treatment by Targeting YAP. *Target. Oncol.* **17**, 407–431 (2022).
18. Bueno, R. *et al.* Comprehensive genomic analysis of malignant pleural mesothelioma identifies recurrent mutations, gene fusions and splicing alterations. *Nat. Genet.* **48**, 407–416 (2016).
19. Hmeljak, J. *et al.* Integrative Molecular Characterization of Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancer Discov.* **8**, 1548–1565 (2018).

20. Moro, J. *et al.* Diagnostic and Therapeutic Challenges of Malignant Pleural Mesothelioma. *Diagn. Basel Switz.* **12**, 3009 (2022).
21. Ladanyi, M. Implications of P16/CDKN2A deletion in pleural mesotheliomas. *Lung Cancer Amst. Neth.* **49 Suppl 1**, S95-98 (2005).
22. Delaunay, T. *et al.* Frequent Homozygous Deletions of Type I Interferon Genes in Pleural Mesothelioma Confer Sensitivity to Oncolytic Measles Virus. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* **15**, 827–842 (2020).
23. Cheng, Y. Y. *et al.* CDKN2A and MTAP Are Useful Biomarkers Detectable by Droplet Digital PCR in Malignant Pleural Mesothelioma: A Potential Alternative Method in Diagnosis Compared to Fluorescence In Situ Hybridisation. *Front. Oncol.* **10**, 579327 (2020).
24. Illei, P. B., Rusch, V. W., Zakowski, M. F. & Ladanyi, M. Homozygous deletion of CDKN2A and codeletion of the methylthioadenosine phosphorylase gene in the majority of pleural mesotheliomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **9**, 2108–2113 (2003).
25. Hwang, H. C. *et al.* Utility of BAP1 Immunohistochemistry and p16 (CDKN2A) FISH in the Diagnosis of Malignant Mesothelioma in Effusion Cytology Specimens. *Am. J. Surg. Pathol.* **40**, 120–126 (2016).
26. Petrilli, A. M. & Fernández-Valle, C. Role of Merlin/NF2 Inactivation in Tumor Biology. *Oncogene* **35**, 537–548 (2016).
27. Louie, B. H. & Kurzrock, R. BAP1: Not Just a BRCA1-Associated Protein. *Cancer Treat. Rev.* **90**, 102091 (2020).
28. Dacic, S. Pleural mesothelioma classification-update and challenges. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **35**, 51–56 (2022).

29. Enomoto, Y. *et al.* Epidermal growth factor receptor mutations in malignant pleural and peritoneal mesothelioma. *J. Clin. Pathol.* **65**, 522–527 (2012).
30. Zanella, C. L., Posada, J., Tritton, T. R. & Mossman, B. T. Asbestos causes stimulation of the extracellular signal-regulated kinase 1 mitogen-activated protein kinase cascade after phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* **56**, 5334–5338 (1996).
31. Lee, T. C. *et al.* Normal human mesothelial cells and mesothelioma cell lines express insulin-like growth factor I and associated molecules. *Cancer Res.* **53**, 2858–2864 (1993).
32. Metheny-Barlow, L. J., Flynn, B., van Gijssel, H. E., Marrogi, A. & Gerwin, B. I. Paradoxical effects of platelet-derived growth factor-A overexpression in malignant mesothelioma. Antiproliferative effects in vitro and tumorigenic stimulation in vivo. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **24**, 694–702 (2001).
33. Kumar-Singh, S., Weyler, J., Martin, M. J. H., Vermeulen, P. B. & Van Marck, E. Angiogenic cytokines in mesothelioma: a study of VEGF, FGF-1 and -2, and TGF β expression. *J. Pathol.* **189**, 72–78 (1999).
34. Sayan, M. & Mossman, B. T. The NLRP3 inflammasome in pathogenic particle and fibre-associated lung inflammation and diseases. *Part. Fibre Toxicol.* **13**, 51 (2016).
35. Tsao, A. S., Pass, H. I., Rimmer, A. & Mansfield, A. S. New Era for Malignant Pleural Mesothelioma: Updates on Therapeutic Options. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **40**, 681–692 (2022).
36. WD, T., E, B., AP, B., A, M. & AG, N. *WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart.*

37. Husain, A. N. *et al.* Guidelines for Pathologic Diagnosis of Malignant Mesothelioma 2017 Update of the Consensus Statement From the International Mesothelioma Interest Group. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **142**, 89–108 (2018).
38. Park, E.-K. *et al.* Factors affecting soluble mesothelin related protein levels in an asbestos-exposed population. *Clin. Chem. Lab. Med.* **48**, 869–874 (2010).
39. Pass, H. I., Alimi, M., Carbone, M., Yang, H. & Goparaju, C. M. Mesothelioma Biomarkers: Discovery in Search of Validation. *Thorac. Surg. Clin.* **30**, 395–423 (2020).
40. Sapede, C. *et al.* Aberrant splicing and protease involvement in mesothelin release from epithelioid mesothelioma cells. *Cancer Sci.* **99**, 590–594 (2008).
41. Hollevoet, K. *et al.* Serum mesothelin for diagnosing malignant pleural mesothelioma: an individual patient data meta-analysis. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **30**, 1541–1549 (2012).
42. Ying, S. *et al.* Serum HMGB1 as a Potential Biomarker for Patients with Asbestos-Related Diseases. *Dis. Markers* **2017**, 5756102 (2017).
43. Napolitano, A. *et al.* HMGB1 and Its Hyperacetylated Isoform are Sensitive and Specific Serum Biomarkers to Detect Asbestos Exposure and to Identify Mesothelioma Patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **22**, 3087–3096 (2016).
44. Onda, M. *et al.* Megakaryocyte potentiation factor cleaved from mesothelin precursor is a useful tumor marker in the serum of patients with mesothelioma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **12**, 4225–4231 (2006).
45. Hu, Z.-D., Liu, X.-F., Liu, X.-C., Ding, C.-M. & Hu, C.-J. Diagnostic accuracy of osteopontin for malignant pleural mesothelioma: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **433**, 44–48 (2014).

46. Pei, D. *et al.* Diagnostic and prognostic utilities of humoral fibulin-3 in malignant pleural mesothelioma: Evidence from a meta-analysis. *Oncotarget* **8**, 13030–13038 (2017).
47. Gueugnon, F. *et al.* Identification of Novel Markers for the Diagnosis of Malignant Pleural Mesothelioma. *Am. J. Pathol.* **178**, 1033–1042 (2011).
48. Blanquart, C. *et al.* CCL2, Galectin-3, and SMRP Combination Improves the Diagnosis of Mesothelioma in Pleural Effusions. *J. Thorac. Oncol.* **7**, 883–889 (2012).
49. Lo Russo, G. *et al.* MicroRNAs for the Diagnosis and Management of Malignant Pleural Mesothelioma: A Literature Review. *Front. Oncol.* **8**, 650 (2018).
50. Sugarbaker, D. J. & Wolf, A. S. Surgery for malignant pleural mesothelioma. *Expert Rev. Respir. Med.* **4**, 363–372 (2010).
51. Kucukoner, M. *et al.* Clinical characteristics, treatment, and survival outcomes in malignant pleural mesothelioma: A institution experience in Turkey. *J. Clin. Oncol.* **31**, e18544–e18544 (2013).
52. de Perrot, M. *et al.* Accelerated hemithoracic radiation followed by extrapleural pneumonectomy for malignant pleural mesothelioma. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **151**, 468–473 (2016).
53. Oun, R., Moussa, Y. E. & Wheate, N. J. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Trans. Camb. Engl. 2003* **47**, 6645–6653 (2018).
54. Gibbs, D. & Jackman, A. Pemetrexed disodium. *Nat. Rev. Drug Discov. Suppl*, S16-17 (2005).
55. Rosenberg, S. A. & Lotze, M. T. Cancer immunotherapy using interleukin-2 and interleukin-2-activated lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **4**, 681–709 (1986).

56. Francisco, L. M., Sage, P. T. & Sharpe, A. H. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol. Rev.* **236**, 219–242 (2010).
57. Buchbinder, E. & Hodi, F. S. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 and immune checkpoint blockade. *J. Clin. Invest.* **125**, 3377–3383 (2015).
58. Eberst, G. *et al.* Health-Related Quality of Life Impact from Adding Bevacizumab to Cisplatin-Pemetrexed in Malignant Pleural Mesothelioma in the MAPS IFCT-GFPC-0701 Phase III Trial. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **25**, 5759–5765 (2019).
59. Zalcman, G. *et al.* Bevacizumab for newly diagnosed pleural mesothelioma in the Mesothelioma Avastin Cisplatin Pemetrexed Study (MAPS): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet* **387**, 1405–1414 (2016).
60. Fennell, D. A., Dooloo, S. & Harber, J. Immunotherapy approaches for malignant pleural mesothelioma. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **19**, 573–584 (2022).
61. Pelner, L., Fowler, G. A. & Nauts, H. C. Effects of concurrent infections and their toxins on the course of leukemia. *Acta Med. Scand. Suppl.* **338**, 1–47 (1958).
62. Viral oncolysis by herpes simplex virus and other viruses: Cancer Biology & Therapy: Vol 4, No 5. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cbt.4.5.1820>.
63. Kelly, E. & Russell, S. J. History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **15**, 651–659 (2007).
64. Reprogrammed viruses as cancer therapeutics: targeted, armed and shielded | Nature Reviews Microbiology. <https://www.nature.com/articles/nrmicro1927>.
65. Kaufman, H. L., Kohlhapp, F. J. & Zloza, A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 642–662 (2015).
66. Achard, C. *et al.* Lighting a Fire in the Tumor Microenvironment Using Oncolytic Immunotherapy. *EBioMedicine* **31**, 17–24 (2018).

67. Galluzzi, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **25**, 486–541 (2018).
68. Jorgensen, I., Rayamajhi, M. & Miao, E. A. Programmed cell death as a defence against infection. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 151–164 (2017).
69. Upton, J. W. & Chan, F. K.-M. Staying Alive: Cell Death in Anti-Viral Immunity. *Mol. Cell* **54**, 273–280 (2014).
70. Pol, J. G., Workenhe, S. T., Konda, P., Gujar, S. & Kroemer, G. Cytokines in oncolytic virotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* **56**, 4–27 (2020).
71. Cruz, F. M., Colbert, J. D., Merino, E., Kriegsman, B. A. & Rock, K. L. The Biology and Underlying Mechanisms of Cross-Presentation of Exogenous Antigens on MHC-I Molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **35**, 149–176 (2017).
72. Gauvrit, A. *et al.* Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response. *Cancer Res.* **68**, 4882–4892 (2008).
73. Mastrangelo, M. J. *et al.* Intratumoral recombinant GM-CSF-encoding virus as gene therapy in patients with cutaneous melanoma. *Cancer Gene Ther.* **6**, 409–422 (1999).
74. Guillaume, J.-B. *et al.* Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **19**, 1147–1158 (2013).
75. Kasturi, S. P. & Pulendran, B. Cross-presentation: avoiding trafficking chaos? *Nat. Immunol.* **9**, 461–463 (2008).
76. Théry, C. & Amigorena, S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 45–51 (2001).

77. Lemos de Matos, A., Franco, L. S. & McFadden, G. Oncolytic Viruses and the Immune System: The Dynamic Duo. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **17**, 349–358 (2020).
78. Andersen, M. H., Schrama, D., Thor Straten, P. & Becker, J. C. Cytotoxic T cells. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 32–41 (2006).
79. Voskoboinik, I., Whisstock, J. C. & Trapani, J. A. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 388–400 (2015).
80. Gonzalez, F. & Ashkenazi, A. New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene* **29**, 4752–4765 (2010).
81. Metro, G. *et al.* Immune checkpoint inhibitors for unresectable malignant pleural mesothelioma. *Hum. Vaccines Immunother.* **17**, 2972–2980.
82. Li, F. *et al.* The association between CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and the clinical outcome of cancer immunotherapy: A systematic review and meta-analysis. *eClinicalMedicine* **41**, (2021).
83. Engeland, C. E. *et al.* CTLA-4 and PD-L1 checkpoint blockade enhances oncolytic measles virus therapy. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **22**, 1949–1959 (2014).
84. Engeland, C. E. & Ungerechts, G. Measles Virus as an Oncolytic Immunotherapy. *Cancers* **13**, 544 (2021).
85. Baldo, A., Galanis, E., Tangy, F. & Herman, P. Biosafety considerations for attenuated measles virus vectors used in virotherapy and vaccination. *Hum. Vaccines Immunother.* **12**, 1102–1116 (2015).
86. Rima, B. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Paramyxoviridae. *J. Gen. Virol.* **100**, 1593–1594 (2019).

87. Hübschen, J. M., Gouandjika-Vasilache, I. & Dina, J. Measles. *Lancet Lond. Engl.* **399**, 678–690 (2022).
88. Jiang, Y., Qin, Y. & Chen, M. Host–Pathogen Interactions in Measles Virus Replication and Anti-Viral Immunity. *Viruses* **8**, 308 (2016).
89. Furuse, Y., Suzuki, A. & Oshitani, H. Origin of measles virus: divergence from rinderpest virus between the 11th and 12th centuries. *Viol. J.* **7**, 52 (2010).
90. Porter, A. & Goldfarb, J. Measles: A dangerous vaccine-preventable disease returns. *Cleve. Clin. J. Med.* **86**, 393–398 (2019).
91. Holzmann, H., Hengel, H., Tenbusch, M. & Doerr, H. W. Eradication of measles: remaining challenges. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **205**, 201–208 (2016).
92. Moss, W. J. Measles. *Lancet Lond. Engl.* **390**, 2490–2502 (2017).
93. Kondamudi, N. P. & Waymack, J. R. Measles. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2022).
94. Strebel, P. M. & Orenstein, W. A. Measles. *N. Engl. J. Med.* **381**, 349–357 (2019).
95. Paules, C. I., Marston, H. D. & Fauci, A. S. Measles in 2019 — Going Backward. *N. Engl. J. Med.* **380**, 2185–2187 (2019).
96. Hübschen, J. M., Gouandjika-Vasilache, I. & Dina, J. Measles. *The Lancet* **399**, 678–690 (2022).
97. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease - 10th Edition. <https://www.elsevier.com/books/robbins-and-cotran-pathologic-basis-of-disease/kumar/978-0-323-53113-9>.
98. Laksono, B. M., de Vries, R. D., McQuaid, S., Duprex, W. P. & de Swart, R. L. Measles Virus Host Invasion and Pathogenesis. *Viruses* **8**, 210 (2016).

99. Laksono, B. M. *et al.* Measles skin rash: Infection of lymphoid and myeloid cells in the dermis precedes viral dissemination to the epidermis. *PLoS Pathog.* **16**, e1008253 (2020).
100. Mühlebach, M. D. *et al.* Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature* **480**, 530–533 (2011).
101. Fisher, D. L., Defres, S. & Solomon, T. Measles-induced encephalitis. *QJM Mon. J. Assoc. Physicians* **108**, 177–182 (2015).
102. Avota, E., Gassert, E. & Schneider-Schaulies, S. Measles virus-induced immunosuppression: from effectors to mechanisms. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **199**, 227–237 (2010).
103. Mina, M. J. *et al.* Measles virus infection diminishes preexisting antibodies that offer protection from other pathogens. *Science* **366**, 599–606 (2019).
104. Plattet, P., Alves, L., Herren, M. & Aguilar, H. C. Measles Virus Fusion Protein: Structure, Function and Inhibition. *Viruses* **8**, 112 (2016).
105. Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K. & Yanagi, Y. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* **406**, 893–897 (2000).
106. Noyce, R. S. & Richardson, C. D. Nectin 4 is the epithelial cell receptor for measles virus. *Trends Microbiol.* **20**, 429–439 (2012).
107. Kemper, C. & Atkinson, J. P. Measles virus and CD46. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **329**, 31–57 (2009).
108. Fukuhara, H., Mwaba, M. H. & Maenaka, K. Structural characteristics of measles virus entry. *Curr. Opin. Virol.* **41**, 52–58 (2020).
109. Gaudin, Y. Structure des glycoprotéines de fusion virale de classe II dans leur conformation fusogène. *Virologie* **8**, 157–158 (2004).

110. Diot, C., Cosentino, G. & Rameix-Welti, M.-A. Ribonucleoprotein transport in Negative Strand RNA viruses. *Biol. Cell* (2022) doi:10.1111/boc.202200059.
111. Harrison, M. S., Sakaguchi, T. & Schmitt, A. P. Paramyxovirus Assembly and Budding: Building Particles that Transmit Infections. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 1416–1429 (2010).
112. Fernández de Castro, I., Tenorio, R. & Risco, C. Virus Factories. *Encycl. Virol.* 495–500 (2021) doi:10.1016/B978-0-12-814515-9.00001-1.
113. Nakatsu, Y. *et al.* Intracellular Transport of the Measles Virus Ribonucleoprotein Complex Is Mediated by Rab11A-Positive Recycling Endosomes and Drives Virus Release from the Apical Membrane of Polarized Epithelial Cells. *J. Virol.* **87**, 4683–4693 (2013).
114. Rima, B. K. & Duprex, W. P. The measles virus replication cycle. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **329**, 77–102 (2009).
115. Structure, dynamics and phase separation of measles virus RNA replication machinery - ScienceDirect.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1879625720300274?via%3Di>
hub.
116. Salditt, A. *et al.* Measles virus M protein-driven particle production does not involve the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) system. *J. Gen. Virol.* **91**, 1464–1472 (2010).
117. Naim, H. Y., Ehler, E. & Billeter, M. A. Measles virus matrix protein specifies apical virus release and glycoprotein sorting in epithelial cells. *EMBO J.* **19**, 3576–3585 (2000).
118. Ke, Z. *et al.* Promotion of virus assembly and organization by the measles virus matrix protein. *Nat. Commun.* **9**, 1736 (2018).

119. El Najjar, F., Schmitt, A. P. & Dutch, R. E. Paramyxovirus Glycoprotein Incorporation, Assembly and Budding: A Three Way Dance for Infectious Particle Production. *Viruses* **6**, 3019–3054 (2014).
120. Singh, B. K. *et al.* Cell-to-Cell Contact and Nectin-4 Govern Spread of Measles Virus from Primary Human Myeloid Cells to Primary Human Airway Epithelial Cells. *J. Virol.* **90**, 6808–6817 (2016).
121. Ludlow, M., McQuaid, S., Milner, D., de Swart, R. L. & Duprex, W. P. Pathological consequences of systemic measles virus infection. *J. Pathol.* **235**, 253–265 (2015).
122. White, R. G. & Boyd, J. F. The effect of measles on the thymus and other lymphoid tissues. *Clin. Exp. Immunol.* **13**, 343–357 (1973).
123. Leroy, H. *et al.* Virus-Mediated Cell-Cell Fusion. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 9644 (2020).
124. Sato, Y. *et al.* Cell-to-Cell Measles Virus Spread between Human Neurons Is Dependent on Hemagglutinin and Hyperfusogenic Fusion Protein. *J. Virol.* **92**, e02166-17 (2018).
125. Pasquinucci, G. Possible effect of measles on leukaemia. *Lancet Lond. Engl.* **1**, 136 (1971).
126. Bluming, A. Z. & Ziegler, J. L. Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection. *Lancet Lond. Engl.* **2**, 105–106 (1971).
127. Enders, J. F. & Peebles, T. C. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* **86**, 277–286 (1954).
128. Bankamp, B., Takeda, M., Zhang, Y., Xu, W. & Rota, P. A. Genetic characterization of measles vaccine strains. *J. Infect. Dis.* **204 Suppl 1**, S533-548 (2011).

129. Griffin, D. E. & Pan, C. H. Measles: old vaccines, new vaccines. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **330**, 191–212 (2009).
130. Langfield, K. K., Walker, H. J., Gregory, L. C. & Federspiel, M. J. Manufacture of measles viruses. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **737**, 345–366 (2011).
131. Guillerme, J.-B., Gregoire, M., Tangy, F. & Fonteneau, J.-F. Antitumor Virotherapy by Attenuated Measles Virus (MV). *Biology* **2**, 587–602 (2013).
132. Monafo, W. J. *et al.* Disseminated measles infection after vaccination in a child with a congenital immunodeficiency. *J. Pediatr.* **124**, 273–276 (1994).
133. Angel, J. B. *et al.* Vaccine-associated measles pneumonitis in an adult with AIDS. *Ann. Intern. Med.* **129**, 104–106 (1998).
134. Hernandez, N. *et al.* Inherited IFNAR1 deficiency in otherwise healthy patients with adverse reaction to measles and yellow fever live vaccines. *J. Exp. Med.* **216**, 2057–2070 (2019).
135. Suwanmanee, S., Ghimire, S., Edwards, J. & Griffin, D. E. Infection of Pro- and Anti-Inflammatory Macrophages by Wild Type and Vaccine Strains of Measles Virus: NLRP3 Inflammasome Activation Independent of Virus Production. *Viruses* **15**, 260 (2023).
136. Diamond, M. S. *et al.* Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J. Exp. Med.* **208**, 1989–2003 (2011).
137. Fuertes, M. B. *et al.* Host type I IFN signals are required for antitumor CD8⁺ T cell responses through CD8 α ⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* **208**, 2005–2016 (2011).
138. Vitiello, G. A. F., Ferreira, W. A. S., Cordeiro de Lima, V. C. & Medina, T. da S. Antiviral Responses in Cancer: Boosting Antitumor Immunity Through Activation of Interferon Pathway in the Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* **12**, (2021).

139. McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A. & O'Garra, A. Type I interferons in infectious disease. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 87–103 (2015).
140. XIE, C. *et al.* Effects of IRF1 and IFN- β interaction on the M1 polarization of macrophages and its antitumor function. *Int. J. Mol. Med.* **38**, 148–160 (2016).
141. Li, H., Peng, K.-W., Dingli, D., Kratzke, R. A. & Russell, S. J. Oncolytic measles viruses encoding interferon beta and the thyroidal sodium iodide symporter gene for mesothelioma virotherapy. *Cancer Gene Ther.* **17**, 550–558 (2010).
142. Tagawa, M. *et al.* A Possible Anticancer Agent, Type III Interferon, Activates Cell Death Pathways and Produces Antitumor Effects. *Clin. Dev. Immunol.* **2011**, 479013 (2011).
143. Numasaki, M. *et al.* IL-28 elicits antitumor responses against murine fibrosarcoma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 5086–5098 (2007).
144. Lillo, S. & Saleh, M. Inflammasomes in Cancer Progression and Anti-Tumor Immunity. *Front. Cell Dev. Biol.* **10**, (2022).
145. Kantono, M. & Guo, B. Inflammasomes and Cancer: The Dynamic Role of the Inflammasome in Tumor Development. *Front. Immunol.* **8**, 1132 (2017).
146. Wilson, E. B. & Brooks, D. G. The role of IL-10 in regulating immunity to persistent viral infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **350**, 39–65 (2011).
147. Donnelly, O. G. *et al.* Measles virus causes immunogenic cell death in human melanoma. *Gene Ther.* **20**, 7–15 (2013).
148. Pidelaserra-Martí, G. & Engeland, C. E. Mechanisms of measles virus oncolytic immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* **56**, 28–38 (2020).
149. Viral fusogenic membrane glycoproteins kill solid tumor cells by nonapoptotic mechanisms that promote cross presentation of tumor antigens by dendritic cells - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12438252/>.

150. Higuchi, H. *et al.* Viral fusogenic membrane glycoprotein expression causes syncytia formation with bioenergetic cell death: implications for gene therapy. *Cancer Res.* **60**, 6396–6402 (2000).
151. Tan, D. Q. *et al.* Macrophage response to oncolytic paramyxoviruses potentiates virus-mediated tumor cell killing. *Eur. J. Immunol.* **46**, 919–928 (2016).
152. Krabbe, T. & Altomonte, J. Fusogenic Viruses in Oncolytic Immunotherapy. *Cancers* **10**, 216 (2018).
153. Backhaus, P. S. *et al.* Immunological Effects and Viral Gene Expression Determine the Efficacy of Oncolytic Measles Vaccines Encoding IL-12 or IL-15 Agonists. *Viruses* **11**, 914 (2019).
154. Veinalde, R. *et al.* Oncolytic measles virus encoding interleukin-12 mediates potent antitumor effects through T cell activation. *Oncoimmunology* **6**, e1285992 (2017).
155. Kumar, A., Taghi Khani, A., Sanchez Ortiz, A. & Swaminathan, S. GM-CSF: A Double-Edged Sword in Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* **13**, 901277 (2022).
156. Fu, H.-W. & Lai, Y.-C. The Role of Helicobacter pylori Neutrophil-Activating Protein in the Pathogenesis of H. pylori and Beyond: From a Virulence Factor to Therapeutic Targets and Therapeutic Agents. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 91 (2022).
157. Full article: Rationale for IL-15 superagonists in cancer immunotherapy. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14712598.2020.1738379>.
158. Speck, T. *et al.* Targeted BiTE Expression by an Oncolytic Vector Augments Therapeutic Efficacy Against Solid Tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **24**, 2128–2137 (2018).

159. Busch, E. *et al.* Measles Vaccines Designed for Enhanced CD8+ T Cell Activation. *Viruses* **12**, 242 (2020).
160. Doniņa, S. *et al.* Adapted ECHO-7 virus Rigvir immunotherapy (oncolytic virotherapy) prolongs survival in melanoma patients after surgical excision of the tumour in a retrospective study. *Melanoma Res.* **25**, 421–426 (2015).
161. Cheng, P.-H., Wechman, S. L., McMasters, K. M. & Zhou, H. S. Oncolytic Replication of E1b-Deleted Adenoviruses. *Viruses* **7**, 5767–5779 (2015).
162. Andtbacka, R. H. I. *et al.* Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **33**, 2780–2788 (2015).
163. Intratumoral oncolytic herpes virus G47 Δ for residual or recurrent glioblastoma: a phase 2 trial | Nature Medicine. <https://www.nature.com/articles/s41591-022-01897-x>.
164. Kuryk, L., Møller, A.-S. W. & Jaderberg, M. Combination of immunogenic oncolytic adenovirus ONCOS-102 with anti-PD-1 pembrolizumab exhibits synergistic antitumor effect in humanized A2058 melanoma huNOG mouse model. *Oncoimmunology* **8**, e1532763 (2019).
165. Humeau, J., Le Naour, J., Galluzzi, L., Kroemer, G. & Pol, J. G. Trial watch: intratumoral immunotherapy. *Oncoimmunology* **10**, 1984677 (2021).
166. Pol, J. G. *et al.* Trial Watch: Oncolytic viro-immunotherapy of hematologic and solid tumors. *Oncoimmunology* **7**, e1503032 (2018).
167. Harrington, K., Freeman, D. J., Kelly, B., Harper, J. & Soria, J.-C. Optimizing oncolytic virotherapy in cancer treatment. *Nat. Rev. Drug Discov.* **18**, 689–706 (2019).

168. Chesney, J. A. *et al.* Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Global Phase III Trial of Talimogene Laherparepvec Combined With Pembrolizumab for Advanced Melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **41**, 528–540 (2023).
169. Long, G. V. *et al.* Efficacy analysis of MASTERKEY-265 phase 1b study of talimogene laherparepvec (T-VEC) and pembrolizumab (pembro) for unresectable stage IIIB-IV melanoma. *J. Clin. Oncol.* **34**, 9568–9568 (2016).
170. Talimogene Laherparepvec With Pembrolizumab in Melanoma Following Progression on Prior Anti-PD-1 Based Therapy (MASTERKEY-115) (Mk-3475-A07/KEYNOTE-A07). - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04068181>.
171. Dummer, R., Hoeller, C., Gruter, I. P. & Michielin, O. Combining talimogene laherparepvec with immunotherapies in melanoma and other solid tumors. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **66**, 683–695 (2017).
172. Chesney, J. *et al.* Randomized, Open-Label Phase II Study Evaluating the Efficacy and Safety of Talimogene Laherparepvec in Combination With Ipilimumab Versus Ipilimumab Alone in Patients With Advanced, Unresectable Melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **36**, 1658–1667 (2018).
173. Pease, D. F. & Kratzke, R. A. Oncolytic Viral Therapy for Mesothelioma. *Front. Oncol.* **7**, 179 (2017).
174. Danson, S. J. *et al.* Oncolytic herpesvirus therapy for mesothelioma - A phase I/IIa trial of intrapleural administration of HSV1716. *Lung Cancer Amst. Neth.* **150**, 145–151 (2020).
175. Jaderberg, M. *et al.* 361 A randomised open-label phase I/II study adding ONCOS-102 to pemetrexed/cisplatin in patients with unresectable malignant

- pleural mesothelioma – 12 month analysis of biomarkers and clinical outcomes. *J. Immunother. Cancer* **8**, (2020).
176. Dingli, D. *et al.* Image-guided radiovirotherapy for multiple myeloma using a recombinant measles virus expressing the thyroidal sodium iodide symporter. *Blood* **103**, 1641–1646 (2004).
177. Peng, K.-W. *et al.* Intraperitoneal therapy of ovarian cancer using an engineered measles virus. *Cancer Res.* **62**, 4656–4662 (2002).
178. Msaouel, P. *et al.* Clinical Trials with Oncolytic Measles Virus: Current Status and Future Prospects. *Curr. Cancer Drug Targets* **18**, 177–187 (2018).
179. Russell, S. J. *et al.* Remission of Disseminated Cancer After Systemic Oncolytic Virotherapy. *Mayo Clin. Proc.* **89**, 926–933 (2014).
180. Galanis, E. *et al.* Oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter to treat drug-resistant ovarian cancer. *Cancer Res.* **75**, 22–30 (2015).
181. Packiriswamy, N. *et al.* Oncolytic measles virus therapy enhances tumor antigen-specific T-cell responses in patients with multiple myeloma. *Leukemia* **34**, 3310–3322 (2020).
182. Galanis, E. *et al.* Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer. *Cancer Res.* **70**, 875–882 (2010).
183. Amedei, A. *et al.* The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* promotes Th1 immune responses. *J. Clin. Invest.* **116**, 1092–1101 (2006).
184. Viker, K. B. *et al.* Preclinical safety assessment of MV-s-NAP, a novel oncolytic measles virus strain armed with an *H. pylori* immunostimulatory bacterial transgene. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **26**, 532–546 (2022).

185. Dispenzieri, A. *et al.* Phase I trial of systemic administration of Edmonston strain of measles virus genetically engineered to express the sodium iodide symporter in patients with recurrent or refractory multiple myeloma. *Leukemia* **31**, 2791–2798 (2017).
186. Myers, R. *et al.* Toxicology study of repeat intracerebral administration of a measles virus derivative producing carcinoembryonic antigen in rhesus macaques in support of a phase I/II clinical trial for patients with recurrent gliomas. *Hum. Gene Ther.* **19**, 690–698 (2008).
187. Fonteneau, J.-F. & Quemeneur, É. Oncolytic Immunovirotherapy: An Emerging Strategy for Cancer Treatment. **3**, (2019).
188. Bommareddy, P. K., Shettigar, M. & Kaufman, H. L. Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 498–513 (2018).
189. Balkwill, F. R., Capasso, M. & Hagemann, T. The tumor microenvironment at a glance. *J. Cell Sci.* **125**, 5591–5596 (2012).
190. Invernizzi, R., Lloyd, C. M. & Molyneaux, P. L. Respiratory microbiome and epithelial interactions shape immunity in the lungs. *Immunology* **160**, 171–182 (2020).
191. Bernhard, E. J. Interventions that induce modifications in the tumor microenvironment. *Cancer Radiother. J. Soc. Francaise Radiother. Oncol.* **15**, 376–382 (2011).
192. Yanagi, Y., Takeda, M., Ohno, S. & Seki, F. Measles virus receptors and tropism. *Jpn. J. Infect. Dis.* **59**, 1–5 (2006).
193. Elvington, M., Liszewski, M. K. & Atkinson, J. P. CD46 and Oncologic Interactions: Friendly Fire against Cancer. *Antibodies* **9**, 59 (2020).

194. Anderson, B. D., Nakamura, T., Russell, S. J. & Peng, K.-W. High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus. *Cancer Res.* **64**, 4919–4926 (2004).
195. Lok, A. *et al.* p53 regulates CD46 expression and measles virus infection in myeloma cells. *Blood Adv.* **2**, 3492–3505 (2018).
196. M-Rabet, M., Bertucci, F., Birnbaum, D. & Lopez, M. Nectine-4 - Un biomarqueur pronostique et une cible thérapeutique potentielle dans le cancer du sein triple-négatif. *médecine/sciences* **33**, 936–939 (2017).
197. Romanets-Korbut, O. *et al.* Expression of CD150 in tumors of the central nervous system: identification of a novel isoform. *PLoS One* **10**, e0118302 (2015).
198. Schnorr, J. J. *et al.* Measles virus-induced down-regulation of CD46 is associated with enhanced sensitivity to complement-mediated lysis of infected cells. *Eur. J. Immunol.* **25**, 976–984 (1995).
199. Aubert, N., Brunel, S., Olive, D. & Marodon, G. Blockade of HVEM for Prostate Cancer Immunotherapy in Humanized Mice. *Cancers* **13**, 3009 (2021).
200. Aubert, N., Brunel, S., Olive, D. & Marodon, G. TNFRSF14 (HVEM) is a novel immune checkpoint for cancer immunotherapy in humanized mice. 711119 Preprint at <https://doi.org/10.1101/711119> (2020).
201. Jayawardena, N., Burga, L. N., Poirier, J. T. & Bostina, M. Virus–Receptor Interactions: Structural Insights For Oncolytic Virus Development. *Oncolytic Virotherapy* **8**, 39–56 (2019).
202. Chen, C.-H., Chen, W.-Y., Lin, S.-F. & Wong, R. J. Epithelial-mesenchymal transition enhances response to oncolytic herpesviral therapy through nectin-1. *Hum. Gene Ther.* **25**, 539–551 (2014).

203. Nagano, S., Perentes, J. Y., Jain, R. K. & Boucher, Y. Cancer cell death enhances the penetration and efficacy of oncolytic herpes simplex virus in tumors. *Cancer Res.* **68**, 3795–3802 (2008).
204. Dash, A. S. & Patel, M. R. Viroimmunotherapy of Thoracic Cancers. *Biomedicines* **5**, 2 (2017).
205. Escutenaire, S. *et al.* In vivo and in vitro distribution of type 5 and fiber-modified oncolytic adenoviruses in human blood compartments. *Ann. Med.* **43**, 151–163 (2011).
206. Carlisle, R. C. *et al.* Human erythrocytes bind and inactivate type 5 adenovirus by presenting Coxsackie virus-adenovirus receptor and complement receptor 1. *Blood* **113**, 1909–1918 (2009).
207. Shashkova, E. V., Doronin, K., Senac, J. S. & Barry, M. A. Macrophage depletion combined with anticoagulant therapy increases therapeutic window of systemic treatment with oncolytic adenovirus. *Cancer Res.* **68**, 5896–5904 (2008).
208. Allen, I. V. *et al.* Macrophages and Dendritic Cells Are the Predominant Cells Infected in Measles in Humans. *mSphere* **3**, e00570-17 (2018).
209. Roscic-Mrkic, B. *et al.* Roles of Macrophages in Measles Virus Infection of Genetically Modified Mice. *J. Virol.* **75**, 3343–3351 (2001).
210. Grosjean, I. *et al.* Measles Virus Infects Human Dendritic Cells and Blocks Their Allostimulatory Properties for CD4+ T Cells. *J. Exp. Med.* **186**, 801–812 (1997).
211. Reeh, M. *et al.* Presence of the Coxsackievirus and Adenovirus Receptor (CAR) in human neoplasms: a multitumour array analysis. *Br. J. Cancer* **109**, 1848–1858 (2013).
212. Garrido, F. & Aptsiauri, N. Cancer immune escape: MHC expression in primary tumours versus metastases. *Immunology* **158**, 255–266 (2019).

213. Ravindranath, N. M. H. & Shuler, C. Expression of complement restriction factors (CD46, CD55 & CD59) in head and neck squamous cell carcinomas. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* **35**, 560–567 (2006).
214. Gorter, A. *et al.* Expression of CD46, CD55, and CD59 on renal tumor cell lines and their role in preventing complement-mediated tumor cell lysis. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **74**, 1039–1049 (1996).
215. Wang, X. *et al.* High expression of nectin-1 indicates a poor prognosis and promotes metastasis in hepatocellular carcinoma. *Front. Oncol.* **12**, 953529 (2022).
216. Kobecki, J., Gajdzis, P., Mazur, G. & Chabowski, M. Nectins and Nectin-like Molecules in Colorectal Cancer: Role in Diagnostics, Prognostic Values, and Emerging Treatment Options: A Literature Review. *Diagnostics* **12**, 3076 (2022).
217. Stranzl, A., Schmidt, H., Winkler, R. & Kostner, G. M. Low-density lipoprotein receptor mRNA in human breast cancer cells: influence by PKC modulators. *Breast Cancer Res. Treat.* **42**, 195–205 (1997).
218. Sanders, C. *et al.* Nectin-4 is widely expressed in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* **13**, 1166–1173 (2022).
219. Rogmans, C. *et al.* Nectin-4 as Blood-Based Biomarker Enables Detection of Early Ovarian Cancer Stages. *Cancers* **14**, 5867 (2022).
220. Gordiienko, I. M., Lykhova, O. O., Shcherbina, V. M. & Shlapatska, L. M. SLAMF1/CD150 expression and topology in prostate and breast cancer cell lines. *Exp. Oncol.* **43**, 312–316 (2021).

221. Huang, X., Zhang, J. & Zheng, Y. ANTXR1 Is a Prognostic Biomarker and Correlates With Stromal and Immune Cell Infiltration in Gastric Cancer. *Front. Mol. Biosci.* **7**, (2020).
222. Zhao, C. *et al.* Dysregulation of JAM-A plays an important role in human tumor progression. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **7**, 7242–7248 (2014).
223. Zhou, X., Yang, G. & Guan, F. Biological Functions and Analytical Strategies of Sialic Acids in Tumor. *Cells* **9**, 273 (2020).
224. Iguchi-Manaka, A. *et al.* Increased Soluble CD155 in the Serum of Cancer Patients. *PLoS ONE* **11**, e0152982 (2016).
225. Wilkins, C. & Gale, M. Recognition of viruses by cytoplasmic sensors. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 41–47 (2010).
226. Thompson, M. R., Kaminski, J. J., Kurt-Jones, E. A. & Fitzgerald, K. A. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses* **3**, 920–940 (2011).
227. Monteiro, J. T. & Lepenies, B. Myeloid C-Type Lectin Receptors in Viral Recognition and Antiviral Immunity. *Viruses* **9**, 59 (2017).
228. Kawai, T. & Akira, S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat. Immunol.* **7**, 131–137 (2006).
229. Goubau, D., Deddouche, S. & Reis e Sousa, C. Cytosolic sensing of viruses. *Immunity* **38**, 855–869 (2013).
230. Hernández-Díaz, T., Valiente-Echeverría, F. & Soto-Rifo, R. RNA Helicase DDX3: A Double-Edged Sword for Viral Replication and Immune Signaling. *Microorganisms* **9**, 1206 (2021).
231. Sabbah, A. *et al.* Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. *Nat. Immunol.* **10**, 1073–1080 (2009).

232. Gray, E. E. *et al.* The AIM2-like Receptors Are Dispensable for the Interferon Response to Intracellular DNA. *Immunity* **45**, 255–266 (2016).
233. Muruve, D. A. *et al.* The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature* **452**, 103–107 (2008).
234. Olagnier, D. & Hiscott, J. Breaking the barrier: membrane fusion triggers innate antiviral immunity. *Nat. Immunol.* **13**, 713–715 (2012).
235. Barnay-Verdier, S., Maréchal, V. & Borde, C. HMGB1: un lien entre inflammation septique et non septique. *Rev. Francoph. Lab.* **2009**, 59–68 (2009).
236. Zhou, Y. J. & Binder, R. J. The heat shock protein-CD91 pathway mediates tumor immunosurveillance. *OncolImmunology* **3**, e28222 (2014).
237. Roh, J. S. & Sohn, D. H. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw.* **18**, (2018).
238. Pestka, S., Krause, C. D. & Walter, M. R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* **202**, 8–32 (2004).
239. Antonelli, G., Scagnolari, C., Moschella, F. & Proietti, E. Twenty-five years of type I interferon-based treatment: A critical analysis of its therapeutic use. *Cytokine Growth Factor Rev.* **26**, 121–131 (2015).
240. de Veer, M. J. *et al.* Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J. Leukoc. Biol.* **69**, 912–920 (2001).
241. Schoggins, J. W. & Rice, C. M. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr. Opin. Virol.* **1**, 519–525 (2011).
242. Schneider, W. M., Chevillotte, M. D. & Rice, C. M. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 513–545 (2014).
243. Fragkoudis, R. *et al.* The type I interferon system protects mice from Semliki Forest virus by preventing widespread virus dissemination in extraneural tissues,

- but does not mediate the restricted replication of avirulent virus in central nervous system neurons. *J. Gen. Virol.* **88**, 3373–3384 (2007).
244. Sancho-Shimizu, V., Perez de Diego, R., Jouanguy, E., Zhang, S.-Y. & Casanova, J.-L. Inborn errors of anti-viral interferon immunity in humans. *Curr. Opin. Virol.* **1**, 487–496 (2011).
245. Aricò, E., Castiello, L., Capone, I., Gabriele, L. & Belardelli, F. Type I Interferons and Cancer: An Evolving Story Demanding Novel Clinical Applications. *Cancers* **11**, 1943 (2019).
246. Wack, A., Terczyńska-Dyla, E. & Hartmann, R. Guarding the frontiers: the biology of type III interferons. *Nat. Immunol.* **16**, 802–809 (2015).
247. Kotenko, S. V. *et al.* IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol.* **4**, 69–77 (2003).
248. Kotenko, S. V. IFN- λ s. *Curr. Opin. Immunol.* **23**, 583–590 (2011).
249. Bolen, C. R., Ding, S., Robek, M. D. & Kleinstein, S. H. Dynamic expression profiling of type I and type III interferon-stimulated hepatocytes reveals a stable hierarchy of gene expression. *Hepatology* **59**, 1262–1272 (2014).
250. Santer, D. M. *et al.* Differential expression of interferon-lambda receptor 1 splice variants determines the magnitude of the antiviral response induced by interferon-lambda 3 in human immune cells. *PLOS Pathog.* **16**, e1008515 (2020).
251. Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol. Cell* **10**, 417–426 (2002).
252. Guo, H., Callaway, J. B. & Ting, J. P.-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat. Med.* **21**, 677–687 (2015).

253. Kanneganti, T.-D. Central roles of NLRs and inflammasomes in viral infection. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 688–698 (2010).
254. Carty, M., Guy, C. & Bowie, A. G. Detection of Viral Infections by Innate Immunity. *Biochem. Pharmacol.* **183**, 114316 (2021).
255. Dinarello, C. A. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* **8**, 253–265 (1997).
256. Lamkanfi, M. & Dixit, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* **157**, 1013–1022 (2014).
257. Blevins, H. M., Xu, Y., Biby, S. & Zhang, S. The NLRP3 Inflammasome Pathway: A Review of Mechanisms and Inhibitors for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Front. Aging Neurosci.* **14**, (2022).
258. Aarreberg, L. D. *et al.* Interleukin-1 β Signaling in Dendritic Cells Induces Antiviral Interferon Responses. *mBio* **9**, e00342-18 (2018).
259. Rivieccio, M. A. *et al.* The cytokine IL-1 β activates IFN response factor 3 in human fetal astrocytes in culture. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **174**, 3719–3726 (2005).
260. Orzalli, M. H. *et al.* An Antiviral Branch of the IL-1 Signaling Pathway Restricts Immune-Evasive Virus Replication. *Mol. Cell* **71**, 825 (2018).
261. Ca, D. Interleukin-18. *Methods San Diego Calif* **19**, (1999).
262. Yasuda, K., Nakanishi, K. & Tsutsui, H. Interleukin-18 in Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 649 (2019).
263. Seo, S. H. & Webster, R. G. Tumor Necrosis Factor Alpha Exerts Powerful Anti-Influenza Virus Effects in Lung Epithelial Cells. *J. Virol.* **76**, 1071–1076 (2002).
264. A, Y., Kh, P.-M., T, A., X, H. & Lb, I. TNF activates an IRF1-dependent autocrine loop leading to sustained expression of chemokines and STAT1-dependent type I interferon-response genes. *Nat. Immunol.* **9**, (2008).

265. Guidotti, L. G. & Chisari, F. V. Cytokine-Mediated Control of Viral Infections. *Virology* **273**, 221–227 (2000).
266. Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* **21**, 137–148 (2004).
267. Grard, M. *et al.* Homozygous Co-Deletion of Type I Interferons and CDKN2A Genes in Thoracic Cancers: Potential Consequences for Therapy. *Front. Oncol.* **11**, 695770 (2021).
268. Lasfar, A., Gogas, H., Zloza, A., Kaufman, H. L. & Kirkwood, J. M. IFN- λ cancer immunotherapy: new kid on the block. *Immunotherapy* **8**, 877–888 (2016).
269. Dunn, G. P. *et al.* A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat. Immunol.* **6**, 722–729 (2005).
270. Razaghi, A., Brusselaers, N., Björnstedt, M. & Durand-Dubief, M. Copy number alteration of the interferon gene cluster in cancer: Individual patient data meta-analysis prospects to personalized immunotherapy. *Neoplasia* **23**, 1059–1068 (2021).
271. Barriga, F. M. *et al.* MACHETE identifies interferon-encompassing chromosome 9p21.3 deletions as mediators of immune evasion and metastasis. *Nat. Cancer* **3**, 1367–1385 (2022).
272. Marozin, S. *et al.* Inhibition of the IFN- β Response in Hepatocellular Carcinoma by Alternative Spliced Isoform of IFN Regulatory Factor-3. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **16**, 1789–1797 (2008).
273. Adámková, L., Soucková, K. & Kovarík, J. Transcription protein STAT1: biology and relation to cancer. *Folia Biol. (Praha)* **53**, 1–6 (2007).
274. Saloura, V. *et al.* Evaluation of an Attenuated Vesicular Stomatitis Virus Vector Expressing Interferon- β for Use in Malignant Pleural Mesothelioma:

- Heterogeneity in Interferon Responsiveness Defines Potential Efficacy. *Hum. Gene Ther.* **21**, 51–64 (2010).
275. Nakatsu, Y. *et al.* Measles Virus Circumvents the Host Interferon Response by Different Actions of the C and V Proteins. *J. Virol.* **82**, 8296–8306 (2008).
276. Achard, C. *et al.* Sensitivity of human pleural mesothelioma to oncolytic measles virus depends on defects of the type I interferon response. *Oncotarget* **6**, 44892–44904 (2015).
277. Ohno, S., Ono, N., Takeda, M., Takeuchi, K. & Yanagi, Y. Dissection of measles virus V protein in relation to its ability to block alpha/beta interferon signal transduction. *J. Gen. Virol.* **85**, 2991–2999 (2004).
278. Takeda, M. *et al.* Measles Virus Attenuation Associated with Transcriptional Impediment and a Few Amino Acid Changes in the Polymerase and Accessory Proteins. *J. Virol.* **72**, 8690–8696 (1998).
279. Matveeva, O. V. & Chumakov, P. M. Defects in interferon pathways as potential biomarkers of sensitivity to oncolytic viruses. *Rev. Med. Virol.* **28**, e2008 (2018).
280. Ebrahimi, S. *et al.* Interferon-Mediated Tumor Resistance to Oncolytic Virotherapy. *J. Cell. Biochem.* **118**, 1994–1999 (2017).
281. Kurokawa, C. *et al.* Constitutive Interferon Pathway Activation in Tumors as an Efficacy Determinant Following Oncolytic Virotherapy. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **110**, 1123–1132 (2018).
282. Larrieux, A. & Sanjuán, R. Cellular resistance to an oncolytic virus is driven by chronic activation of innate immunity. *iScience* **26**, 105749 (2022).
283. Cai, X., Chiu, Y.-H. & Chen, Z. J. The cGAS-cGAMP-STING Pathway of Cytosolic DNA Sensing and Signaling. *Mol. Cell* **54**, 289–296 (2014).

284. Liu, H. *et al.* Tumor-derived IFN triggers chronic pathway agonism and sensitivity to ADAR loss. *Nat. Med.* **25**, 95–102 (2019).
285. Cañadas, I. *et al.* Tumor innate immunity primed by specific interferon-stimulated endogenous retroviruses. *Nat. Med.* **24**, 1143–1150 (2018).
286. Panda, A. *et al.* Endogenous retrovirus expression is associated with response to immune checkpoint blockade in clear cell renal cell carcinoma. *JCI Insight* **3**, e121522, 121522 (2018).
287. Barber, G. N. STING: infection, inflammation and cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 760–770 (2015).
288. Terlizzi, M., Casolaro, V., Pinto, A. & Sorrentino, R. Inflammasome: Cancer's friend or foe? *Pharmacol. Ther.* **143**, 24–33 (2014).
289. Vogl, M. *et al.* Biomarkers for Malignant Pleural Mesothelioma-A Novel View on Inflammation. *Cancers* **13**, 658 (2021).
290. Thompson, J. K. The Role of Inflammasomes in Asbestos-Induced Mesothelial to Fibroblastic Transition.
- 291.20. Induction of Antiviral Genes by the Tumor Microenvironment Confers Resistance to Virotherapy. *Mol. Ther.* **21**, S8 (2013).
292. Endo, H. & Inoue, M. Dormancy in cancer. *Cancer Sci.* **110**, 474–480 (2019).
293. *Biologie Campbell (9e edition) - Neil Campbell, Jane Reece, Michael Cain, Roberts Jackson, Peter Minorsky - Pearson - Grand format - Librairie Galignani PARIS.*
294. Cooper, G. M. The Eukaryotic Cell Cycle. *Cell Mol. Approach 2nd Ed.* (2000).
295. Leal-Esteban, L. C. & Fajas, L. Cell cycle regulators in cancer cell metabolism. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1866**, 165715 (2020).

296. Barnum, K. J. & O'Connell, M. J. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1170**, 29–40 (2014).
297. Difference Between Mitogen and Growth Factor. *Compare the Difference Between Similar Terms* <https://www.differencebetween.com/difference-between-mitogen-and-growth-factor/> (2021).
298. Wee, P. & Wang, Z. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers* **9**, 52 (2017).
299. Wang, Y.-N. & Hung, M.-C. Nuclear functions and subcellular trafficking mechanisms of the epidermal growth factor receptor family. *Cell Biosci.* **2**, 13 (2012).
300. Che, T.-F. *et al.* Mitochondrial translocation of EGFR regulates mitochondria dynamics and promotes metastasis in NSCLC. *Oncotarget* **6**, 37349–37366 (2015).
301. Ayyappan, S., Prabhakar, D. & Sharma, N. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-targeted Therapies in Esophagogastric Cancer. *Anticancer Res.* **33**, 4139–4155 (2013).
302. Kalucka, J. *et al.* Metabolic control of the cell cycle. *Cell Cycle* **14**, 3379–3388 (2015).
303. Icard, P., Fournel, L., Wu, Z., Alifano, M. & Lincet, H. Interconnection between Metabolism and Cell Cycle in Cancer. *Trends Biochem. Sci.* **44**, 490–501 (2019).
304. Muñoz-Fontela, C. *et al.* Control of virus infection by tumour suppressors. *Carcinogenesis* **28**, 1140–1144 (2007).
305. Nakamura, H., Li, M., Zarycki, J. & Jung, J. U. Inhibition of p53 Tumor Suppressor by Viral Interferon Regulatory Factor. *J. Virol.* **75**, 7572–7582 (2001).

306. Hao, Z. *et al.* Tumor suppressor p53 inhibits porcine epidemic diarrhea virus infection via interferon-mediated antiviral immunity. *Mol. Immunol.* **108**, 68–74 (2019).
307. Tornesello, M. L., Annunziata, C., Tornesello, A. L., Buonaguro, L. & Buonaguro, F. M. Human Oncoviruses and p53 Tumor Suppressor Pathway Deregulation at the Origin of Human Cancers. *Cancers* **10**, 213 (2018).
308. Pikor, L. A., Bell, J. C. & Diallo, J.-S. Oncolytic Viruses: Exploiting Cancer's Deal with the Devil. *Trends Cancer* **1**, 266–277 (2015).
309. VanDeusen, H. R. & Kalejta, R. F. The Retinoblastoma Tumor Suppressor Promotes Efficient Human Cytomegalovirus Lytic Replication. *J. Virol.* **89**, 5012–5021 (2015).
310. Koch, J. *et al.* Targeting the Retinoblastoma/E2F repressive complex by CDK4/6 inhibitors amplifies oncolytic potency of an oncolytic adenovirus. *Nat. Commun.* **13**, 4689 (2022).
311. Carlin, C. R. Role of EGF Receptor Regulatory Networks in the Host Response to Viral Infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **11**, (2022).
312. Zheng, K., Kitazato, K. & Wang, Y. Viruses exploit the function of epidermal growth factor receptor. *Rev. Med. Virol.* **24**, 274–286 (2014).
313. Khanizadeh, S., Hasanvand, B., Esmail Lashgarian, H., Almasian, M. & Goudarzi, G. Interaction of viral oncogenic proteins with the Wnt signaling pathway. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **21**, 651–659 (2018).
314. Correa, R. J. M. *et al.* Myxoma virus-mediated oncolysis of ascites-derived human ovarian cancer cells and spheroids is impacted by differential AKT activity. *Gynecol. Oncol.* **125**, 441–450 (2012).

315. Pavlova, N. N. & Thompson, C. B. THE EMERGING HALLMARKS OF CANCER METABOLISM. *Cell Metab.* **23**, 27–47 (2016).
316. Delpeut, S., Sisson, G., Black, K. M. & Richardson, C. D. Measles Virus Enters Breast and Colon Cancer Cell Lines through a PVRL4-Mediated Macropinocytosis Pathway. *J. Virol.* **91**, e02191-16 (2017).
317. Mercer, J. & Helenius, A. Virus entry by macropinocytosis. *Nat. Cell Biol.* **11**, 510–520 (2009).
318. Mushtaq, M., Darekar, S. & Kashuba, E. DNA Tumor Viruses and Cell Metabolism. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 6468342 (2016).
319. Pouysségur, J. *et al.* 'Warburg effect' controls tumor growth, bacterial, viral infections and immunity - Genetic deconstruction and therapeutic perspectives. *Semin. Cancer Biol.* **86**, 334–346 (2022).
320. Mayer, K. A., Stöckl, J., Zlabinger, G. J. & Gualdoni, G. A. Hijacking the Supplies: Metabolism as a Novel Facet of Virus-Host Interaction. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
321. Ogino, T. *et al.* Involvement of a Cellular Glycolytic Enzyme, Phosphoglycerate Kinase, in Sendai Virus Transcription*. *J. Biol. Chem.* **274**, 35999–36008 (1999).
322. Romano, N. & Scarlata, G. Amino acids requirements of measles virus in hela cells. *Arch. Für Gesamte Virusforsch.* **43**, 359–366 (1973).
323. Mannarino, L. *et al.* Tumor treating fields affect mesothelioma cell proliferation by exerting histotype-dependent cell cycle checkpoint activations and transcriptional modulations. *Cell Death Dis.* **13**, 1–9 (2022).
324. Patel, M. R. & Kratzke, R. A. Chapter 17 - Genetic Engineering of Oncolytic Viruses for Cancer Therapy. in *Translating Gene Therapy to the Clinic* (eds.

- Laurence, J. & Franklin, M.) 261–279 (Academic Press, 2015). doi:10.1016/B978-0-12-800563-7.00017-8.
325. Wang, J.-N., Hu, P., Zeng, M.-S. & Liu, R.-B. Anti-tumor effect of oncolytic herpes simplex virus G47delta on human nasopharyngeal carcinoma. *Chin. J. Cancer* **30**, 831–841 (2011).
326. Delaunay, T. *et al.* High Oncolytic Activity of a Double-Deleted Vaccinia Virus Copenhagen Strain against Malignant Pleural Mesothelioma. *Mol. Ther. Oncolytics* **18**, 573–578 (2020).
327. Sumbria, D., Berber, E., Mathayan, M. & Rouse, B. T. Virus Infections and Host Metabolism—Can We Manage the Interactions? *Front. Immunol.* **11**, 594963 (2021).
328. Anderton, P., Wild, T. F. & Zwingelstein, G. Phospholipids in a measles virus persistent infection: modification of fatty acid metabolism and fatty acid composition of released virus. *J. Gen. Virol.* **62 (Pt 2)**, 249–258 (1982).
329. Minchinton, A. I. & Tannock, I. F. Drug penetration in solid tumours. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 583–592 (2006).
330. Vassilaki, N. & Frakolaki, E. Virus–host interactions under hypoxia. *Microbes Infect.* **19**, 193–203 (2017).
331. Ch'ng, W.-C., Stanbridge, E. J., Yusoff, K. & Shafee, N. The Oncolytic Activity of Newcastle Disease Virus in Clear Cell Renal Carcinoma Cells in Normoxic and Hypoxic Conditions: The Interplay Between von Hippel-Lindau and Interferon- β Signaling. *J. Interferon Cytokine Res.* **33**, 346–354 (2013).
332. Zong, W.-X., Rabinowitz, J. D. & White, E. Mitochondria and Cancer. *Mol. Cell* **61**, 667–676 (2016).

333. Sauvanet, C., Arnauné-Pelloquin, L., David, C., Belenguer, P. & Rojo, M. Dynamique et morphologie mitochondriales - Acteurs, mécanismes et pertinence fonctionnelle. *médecine/sciences* **26**, 823–829 (2010).
334. Ma, Y., Wang, L. & Jia, R. The role of mitochondrial dynamics in human cancers. *Am. J. Cancer Res.* **10**, 1278 (2020).
335. Grosso, S. *et al.* The pathogenesis of mesothelioma is driven by a dysregulated transcriptome. *Nat. Commun.* **12**, 4920 (2021).
336. Scott, I. The role of mitochondria in the mammalian antiviral defense system. *Mitochondrion* **10**, 316–320 (2010).
337. Sato, H. *et al.* Downregulation of mitochondrial biogenesis by virus infection triggers antiviral responses by cyclic GMP-AMP synthase. *PLoS Pathog.* **17**, e1009841 (2021).
338. Xia, M. *et al.* Mitophagy enhances oncolytic measles virus replication by mitigating DDX58/RIG-I-like receptor signaling. *J. Virol.* **88**, 5152–5164 (2014).
339. Vara-Perez, M., Felipe-Abrio, B. & Agostinis, P. Mitophagy in Cancer: A Tale of Adaptation. *Cells* **8**, 493 (2019).
340. Truskowski, K., Amend, S. R. & Pienta, K. J. Dormant cancer cells: programmed quiescence, senescence, or both? *Cancer Metastasis Rev.* (2023) doi:10.1007/s10555-022-10073-z.
341. Xu, D., Yang, H., Schmid, R. A. & Peng, R.-W. Therapeutic Landscape of Malignant Pleural Mesothelioma: Collateral Vulnerabilities and Evolutionary Dependencies in the Spotlight. *Front. Oncol.* **10**, 579464 (2020).
342. Endoh, D. *et al.* CHEMORESISTANCE RELATED TO HYPOXIA ADAPTATION IN MESOTHELIOMA CELLS FROM TUMOR SPHEROIDS. *Exp. Oncol.* **44**, 121–125 (2022).

343. Phan, T. G. & Croucher, P. I. The dormant cancer cell life cycle. *Nat. Rev. Cancer* **20**, 398–411 (2020).
344. Tong, J. G. *et al.* Evidence for differential viral oncolytic efficacy in an in vitro model of epithelial ovarian cancer metastasis. *Mol. Ther. Oncolytics* **2**, 15013 (2015).
345. Li, Q. *et al.* The gamble between oncolytic virus therapy and IFN. *Front. Immunol.* **13**, (2022).
346. Balayan, V. & Guddati, A. K. Tumor Dormancy: Biologic and Therapeutic Implications. *World J. Oncol.* **13**, 8–19 (2022).
347. Shoji-Kawata, S. & Levine, B. Autophagy, antiviral immunity, and viral countermeasures. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1793**, 1478–1484 (2009).
348. Galluzzi, L. *et al.* Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* **36**, 1811–1836 (2017).
349. Jin, K.-T., Tao, X.-H., Fan, Y.-B. & Wang, S.-B. Crosstalk between oncolytic viruses and autophagy in cancer therapy. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* **134**, 110932 (2021).
350. Autophagy during Herpesvirus Infections. <https://encyclopedia.pub/entry/8937>.
351. Joubert, P.-E. *et al.* Autophagy induction by the pathogen receptor CD46. *Cell Host Microbe* **6**, 354–366 (2009).
352. Rozières, A., Viret, C. & Faure, M. Autophagy in Measles Virus Infection. *Viruses* **9**, 359 (2017).
353. Xu, D. *et al.* Malignant pleural mesothelioma co-opts BCL-XL and autophagy to escape apoptosis. *Cell Death Dis.* **12**, 406 (2021).
354. Bhatt, D. K., Chammas, R. & Daemen, T. Resistance Mechanisms Influencing Oncolytic Virotherapy, a Systematic Analysis. *Vaccines* **9**, 1166 (2021).

355. Drug Delivery in Cancer Therapy, Quo Vadis? | Molecular Pharmaceutics.
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00037>.
356. Murthy, V., Katzman, D. & Sterman, D. H. Intrapleural immunotherapy: An update on emerging treatment strategies for pleural malignancy. *Clin. Respir. J.* **13**, 272–279 (2019).
357. Ferguson, M. S., Lemoine, N. R. & Wang, Y. Systemic delivery of oncolytic viruses: hopes and hurdles. *Adv. Virol.* **2012**, 805629 (2012).
358. Marabelle, A., Tselikas, L., de Baere, T. & Houot, R. Intratumoral immunotherapy: using the tumor as the remedy. *Ann. Oncol.* **28**, xii33–xii43 (2017).
359. Heil, M., Eitenmüller, I., Schmitz-Rixen, T. & Schaper, W. Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *J. Cell. Mol. Med.* **10**, 45–55 (2006).
360. Vähä-Koskela, M. & Hinkkanen, A. Tumor Restrictions to Oncolytic Virus. *Biomedicines* **2**, 163–194 (2014).
361. Edwards, J., Cox, G., Walker, R., Waller, D. & Byrne, K. High microvessel density is an independent poor prognostic factor in malignant mesothelioma. *Lung Cancer* **29**, 192–193 (2000).
362. Edwards, J. G. *et al.* Angiogenesis is an independent prognostic factor in malignant mesothelioma. *Br. J. Cancer* **85**, 863–868 (2001).
363. Yasumitsu, A. *et al.* Clinical significance of serum vascular endothelial growth factor in malignant pleural mesothelioma. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* **5**, 479–483 (2010).
364. Miller, A. *et al.* Perfusion Pressure Is a Critical Determinant of the Intratumoral Extravasation of Oncolytic Viruses. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **24**, 306–317 (2016).

365. Tseng, J.-C., Granot, T., DiGiacomo, V., Levin, B. & Meruelo, D. Enhanced specific delivery and targeting of oncolytic Sindbis viral vectors by modulating vascular leakiness in tumor. *Cancer Gene Ther.* **17**, 244–255 (2010).
366. Melamed, S., Israely, T. & Paran, N. Challenges and Achievements in Prevention and Treatment of Smallpox. *Vaccines* **6**, 8 (2018).
367. Coughlin, M. M., Beck, A. S., Bankamp, B. & Rota, P. A. Perspective on Global Measles Epidemiology and Control and the Role of Novel Vaccination Strategies. *Viruses* **9**, 11 (2017).
368. McQuillan, G., Kruszon-Moran, D., Flagg, E. W. & Paulose-Ram, R. Prevalence of Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2 in Persons Aged 14-49: United States, 2015-2016. *NCHS Data Brief* 1–8 (2018).
369. Chen, Y., Yu, D. C., Charlton, D. & Henderson, D. R. Pre-existent adenovirus antibody inhibits systemic toxicity and antitumor activity of CN706 in the nude mouse LNCaP xenograft model: implications and proposals for human therapy. *Hum. Gene Ther.* **11**, 1553–1567 (2000).
370. Dingli, D. *et al.* Interaction of measles virus vectors with Auger electron emitting radioisotopes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **337**, 22–29 (2005).
371. Hirasawa, K. *et al.* Systemic reovirus therapy of metastatic cancer in immune-competent mice. *Cancer Res.* **63**, 348–353 (2003).
372. White, C. L. *et al.* Characterization of the adaptive and innate immune response to intravenous oncolytic reovirus (Dearing type 3) during a phase I clinical trial. *Gene Ther.* **15**, 911–920 (2008).
373. Gong, J., Sachdev, E., Mita, A. C. & Mita, M. M. Clinical development of reovirus for cancer therapy: An oncolytic virus with immune-mediated antitumor activity. *World J. Methodol.* **6**, 25–42 (2016).

374. Garcia-Carbonero, R. *et al.* Phase 1 study of intravenous administration of the chimeric adenovirus enadenotucirev in patients undergoing primary tumor resection. *J. Immunother. Cancer* **5**, 71 (2017).
375. Smith, G. L. *et al.* Vaccinia virus immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity. *J. Gen. Virol.* **94**, 2367–2392 (2013).
376. Breitbach, C. J. *et al.* Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans. *Nature* **477**, 99–102 (2011).
377. Kirn, D. H., Wang, Y., Liang, W., Contag, C. H. & Thorne, S. H. Enhancing poxvirus oncolytic effects through increased spread and immune evasion. *Cancer Res.* **68**, 2071–2075 (2008).
378. Kottke, T. *et al.* Improved Systemic Delivery of Oncolytic Reovirus to Established Tumors Using Preconditioning with Cyclophosphamide-Mediated Treg Modulation and Interleukin-2. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **15**, 561–569 (2009).
379. Peng, K.-W. *et al.* Using clinically approved cyclophosphamide regimens to control the humoral immune response to oncolytic viruses. *Gene Ther.* **20**, 255–261 (2013).
380. Morse, M. A. *et al.* Novel adenoviral vector induces T-cell responses despite anti-adenoviral neutralizing antibodies in colorectal cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **62**, 1293–1301 (2013).
381. Hagedorn, C. & Kreppel, F. Capsid Engineering of Adenovirus Vectors: Overcoming Early Vector-Host Interactions for Therapy. *Hum. Gene Ther.* **28**, 820–832 (2017).
382. Kuhn, I. *et al.* Directed evolution generates a novel oncolytic virus for the treatment of colon cancer. *PLoS One* **3**, e2409 (2008).

383. Muik, A. *et al.* Re-engineering vesicular stomatitis virus to abrogate neurotoxicity, circumvent humoral immunity, and enhance oncolytic potency. *Cancer Res.* **74**, 3567–3578 (2014).
384. Cattaneo, R., Miest, T., Shashkova, E. V. & Barry, M. A. Reprogrammed viruses as cancer therapeutics: targeted, armed and shielded. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 529–540 (2008).
385. Doronin, K., Shashkova, E. V., May, S. M., Hofherr, S. E. & Barry, M. A. Chemical modification with high molecular weight polyethylene glycol reduces transduction of hepatocytes and increases efficacy of intravenously delivered oncolytic adenovirus. *Hum. Gene Ther.* **20**, 975–988 (2009).
386. Roy, D. G., Bell, J. C. & Bourgeois-Daigneault, M.-C. Magnetic targeting of oncolytic VSV-based therapies improves infection of tumor cells in the presence of virus-specific neutralizing antibodies in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **526**, 641–646 (2020).
387. Garofalo, M. *et al.* Antitumor effect of oncolytic virus and paclitaxel encapsulated in extracellular vesicles for lung cancer treatment. *J. Controlled Release* **283**, 223–234 (2018).
388. Castleton, A. *et al.* Human mesenchymal stromal cells deliver systemic oncolytic measles virus to treat acute lymphoblastic leukemia in the presence of humoral immunity. *Blood* **123**, 1327–1335 (2014).
389. Bourgeois-Daigneault, M.-C. *et al.* Neoadjuvant oncolytic virotherapy before surgery sensitizes triple-negative breast cancer to immune checkpoint therapy. *Sci. Transl. Med.* **10**, eaao1641 (2018).
390. Lu, P., Weaver, V. M. & Werb, Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J. Cell Biol.* **196**, 395–406 (2012).

391. Hynes, R. O. & Naba, A. Overview of the Matrisome—An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a004903 (2012).
392. Walker, C., Mojares, E. & Del Río Hernández, A. Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 3028 (2018).
393. Vähä-Koskela, M. J. V. *et al.* Oncolytic capacity of attenuated replicative semliki forest virus in human melanoma xenografts in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res.* **66**, 7185–7194 (2006).
394. Bilbao, R. *et al.* A blood-tumor barrier limits gene transfer to experimental liver cancer: the effect of vasoactive compounds. *Gene Ther.* **7**, 1824–1832 (2000).
395. Toth, K. & Wold, W. S. M. Increasing the Efficacy of Oncolytic Adenovirus Vectors. *Viruses* **2**, 1844–1866 (2010).
396. Yaacov, B. *et al.* Extracellular matrix constituents interfere with Newcastle disease virus spread in solid tissue and diminish its potential oncolytic activity. *J. Gen. Virol.* **93**, 1664–1672 (2012).
397. Zhong, P., Agosto, L. M., Munro, J. B. & Mothes, W. Cell-to-cell transmission of viruses. *Curr. Opin. Virol.* **3**, 44–50 (2013).
398. Aref, S., Bailey, K. & Fielding, A. Measles to the Rescue: A Review of Oncolytic Measles Virus. *Viruses* **8**, 294 (2016).
399. Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C. & Karamanos, N. K. Extracellular matrix structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **97**, 4–27 (2016).
400. Haseley, A. *et al.* Extracellular matrix protein CCN1 limits oncolytic efficacy in glioma. *Cancer Res.* **72**, 1353–1362 (2012).

401. Lee, T. J. *et al.* Enhancing Therapeutic Efficacy of Oncolytic Herpes Simplex Virus-1 with Integrin β 1 Blocking Antibody OS2966. *Mol. Cancer Ther.* **18**, 1127–1136 (2019).
402. Mookherjee, N., Anderson, M. A., Haagsman, H. P. & Davidson, D. J. Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* **19**, 311–332 (2020).
403. Cole, A. M. & Waring, A. J. The role of defensins in lung biology and therapy. *Am. J. Respir. Med. Drugs Devices Interv.* **1**, 249–259 (2002).
404. Droin, N., Hendra, J.-B., Ducoroy, P. & Solary, E. Human defensins as cancer biomarkers and antitumour molecules. *J. Proteomics* **72**, 918–927 (2009).
405. Ahmed, A., Siman-Tov, G., Hall, G., Bhalla, N. & Narayanan, A. Human Antimicrobial Peptides as Therapeutics for Viral Infections. *Viruses* **11**, 704 (2019).
406. Vragliau, C. *et al.* Studies on the Interaction of Tumor-Derived HD5 Alpha Defensins with Adenoviruses and Implications for Oncolytic Adenovirus Therapy. *J. Virol.* **91**, e02030-16 (2017).
407. Serio, G. *et al.* Genomic changes of chromosomes 8p23.1 and 1q21: Novel mutations in malignant mesothelioma. *Lung Cancer Amst. Neth.* **126**, 106–111 (2018).
408. Hubert, P. *et al.* Altered α -defensin 5 expression in cervical squamocolumnar junction: implication in the formation of a viral/tumour-permissive microenvironment. *J. Pathol.* **234**, 464–477 (2014).
409. Anderson, N. M. & Simon, M. C. Tumor Microenvironment. *Curr. Biol. CB* **30**, R921–R925 (2020).

410. Binnewies, M. *et al.* Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat. Med.* **24**, 541–550 (2018).
411. Cornelissen, R. *et al.* Ratio of intratumoral macrophage phenotypes is a prognostic factor in epithelioid malignant pleural mesothelioma. *PloS One* **9**, e106742 (2014).
412. Chéné, A.-L. *et al.* Pleural Effusions from Patients with Mesothelioma Induce Recruitment of Monocytes and Their Differentiation into M2 Macrophages. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* **11**, 1765–1773 (2016).
413. Wu, L. *et al.* Defining and targeting tumor-associated macrophages in malignant mesothelioma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **120**, e2210836120 (2023).
414. De Fonseka, D. *et al.* Lymphocyte predominance in blood, pleural fluid, and tumour stroma; a prognostic marker in pleural mesothelioma. *BMC Pulm. Med.* **22**, 173 (2022).
415. Fulci, G. *et al.* Depletion of peripheral macrophages and brain microglia increases brain tumor titers of oncolytic viruses. *Cancer Res.* **67**, 9398–9406 (2007).
416. Liu, Y.-P., Suksanpaisan, L., Steele, M. B., Russell, S. J. & Peng, K.-W. Induction of antiviral genes by the tumor microenvironment confers resistance to virotherapy. *Sci. Rep.* **3**, 2375 (2013).
417. Naumenko, V. A., Stepanenko, A. A., Lipatova, A. V., Vishnevskiy, D. A. & Chekhonin, V. P. Infection of non-cancer cells: A barrier or support for oncolytic virotherapy? *Mol. Ther. - Oncolytics* **24**, 663–682 (2022).
418. Ilkow, C. S. *et al.* Reciprocal cellular cross-talk within the tumor microenvironment promotes oncolytic virus activity. *Nat. Med.* **21**, 530–536 (2015).
419. Benencia, F. *et al.* Oncolytic HSV exerts direct antiangiogenic activity in ovarian carcinoma. *Hum. Gene Ther.* **16**, 765–778 (2005).

420. Prestwich, R. J. *et al.* The case of oncolytic viruses versus the immune system: waiting on the judgment of Solomon. *Hum. Gene Ther.* **20**, 1119–1132 (2009).
421. Habanjar, O., Diab-Assaf, M., Caldefie-Chezet, F. & Delort, L. 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 12200 (2021).
422. Nath, S. & Devi, G. R. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol. Ther.* **163**, 94–108 (2016).
423. Gunti, S., Hoke, A. T. K., Vu, K. P. & London, N. R. Organoid and Spheroid Tumor Models: Techniques and Applications. *Cancers* **13**, 874 (2021).
424. Simian, M. & Bissell, M. J. Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. *J. Cell Biol.* **216**, 31–40 (2017).
425. Weiswald, L.-B., Bellet, D. & Dangles-Marie, V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia N. Y. N* **17**, 1–15 (2015).
426. Morales, J. S., Raspopovic, J. & Marcon, L. From embryos to embryoids: How external signals and self-organization drive embryonic development. *Stem Cell Rep.* **16**, 1039–1050 (2021).
427. Achilli, T.-M., Meyer, J. & Morgan, J. R. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opin. Biol. Ther.* **12**, 1347–1360 (2012).
428. Lin, R.-Z., Chou, L.-F., Chien, C.-C. M. & Chang, H.-Y. Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and β 1-integrin. *Cell Tissue Res.* **324**, 411–422 (2006).
429. Ryu, N.-E., Lee, S.-H. & Park, H. Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells* **8**, 1620 (2019).

430. Nakamura, M. *et al.* Cytoskeletal inhibitors, anti-adhesion molecule antibodies, and lectins inhibit hepatocyte spheroid formation. *Acta Med. Okayama* **56**, 43–50 (2002).
431. Benien, P. & Swami, A. 3D tumor models: History, advances and future perspectives. *Future Oncol. Lond. Engl.* **10**, 1311–27 (2014).
432. Hirschhaeuser, F. *et al.* Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J. Biotechnol.* **148**, 3–15 (2010).
433. Law, A. M. K. *et al.* Advancements in 3D Cell Culture Systems for Personalizing Anti-Cancer Therapies. *Front. Oncol.* **11**, (2021).
434. Pinto, B., Henriques, A. C., Silva, P. M. A. & Bousbaa, H. Three-Dimensional Spheroids as In Vitro Preclinical Models for Cancer Research. *Pharmaceutics* **12**, 1186 (2020).
435. Shi, H. *et al.* 3-Dimensional mesothelioma spheroids provide closer to natural pathophysiological tumor microenvironment for drug response studies. *Front. Oncol.* **12**, 973576 (2022).
436. Blondy, T. *et al.* Involvement of the M-CSF/IL-34/CSF-1R pathway in malignant pleural mesothelioma. *J. Immunother. Cancer* **8**, e000182 (2020).
437. Olive, P. L. & Durand, R. E. Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics. *Cancer Metastasis Rev.* **13**, 121–138 (1994).
438. Mazzocchi, A. R., Rajan, S. A. P., Votanopoulos, K. I., Hall, A. R. & Skardal, A. In vitro patient-derived 3D mesothelioma tumor organoids facilitate patient-centric therapeutic screening. *Sci. Rep.* **8**, 2886 (2018).
439. Gendre, D. A. J. *et al.* Optimization of tumor spheroid model in mesothelioma and lung cancers and anti-cancer drug testing in H2052/484 spheroids. *Oncotarget* **12**, 2375–2387 (2021).

440. Kim, H., Phung, Y. & Ho, M. Changes in global gene expression associated with 3D structure of tumors: an ex vivo matrix-free mesothelioma spheroid model. *PLoS One* **7**, e39556 (2012).
441. Jagirdar, R. M. *et al.* Cell and extracellular matrix interaction models in benign mesothelial and malignant pleural mesothelioma cells in 2D and 3D in-vitro. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **48**, 543–552 (2021).
442. Allagui, F. *et al.* Modulation of the Type I Interferon Response Defines the Sensitivity of Human Melanoma Cells to Oncolytic Measles Virus. *Curr. Gene Ther.* **16**, 419–428 (2017).
443. Delaunay, T. *et al.* Oncolytic viruses sensitize human tumor cells for NY-ESO-1 tumor antigen recognition by CD4⁺ effector T cells. *Oncolmmunology* **7**, e1407897 (2018).
444. 194. Mechanism of Tumour Penetration by Oncolytic Viruses – Investigation in a 3 Dimensional In Vitro Model. *Mol. Ther.* **18**, S74 (2010).
445. Smith, E., Breznik, J. & Lichty, B. D. Strategies to enhance viral penetration of solid tumors. *Hum. Gene Ther.* **22**, 1053–1060 (2011).
446. Dubreil, L. *et al.* Multiphotonic and Harmonic generation microscopy: an attractive label free imaging and non-destructive observation of collagenic and adipose tissues in pathological muscle context.
447. Li Petri, G. *et al.* Impact of hypoxia on chemoresistance of mesothelioma mediated by the proton-coupled folate transporter, and preclinical activity of new anti-LDH-A compounds. *Br. J. Cancer* **123**, 644–656 (2020).
448. Francis, R. J. *et al.* Characterization of hypoxia in malignant pleural mesothelioma with FMISO PET-CT. *Lung Cancer* **90**, 55–60 (2015).

449. Rosen, L. E. *et al.* Nuclear grade and necrosis predict prognosis in malignant epithelioid pleural mesothelioma: a multi-institutional study. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **31**, 598–606 (2018).
450. Edwards, J. G. *et al.* Tumor necrosis correlates with angiogenesis and is a predictor of poor prognosis in malignant mesothelioma. *Chest* **124**, 1916–1923 (2003).
451. Karsch-Bluman, A. & Benny, O. Necrosis in the Tumor Microenvironment and Its Role in Cancer Recurrence. in *Tumor Microenvironment: Recent Advances* (ed. Birbrair, A.) 89–98 (Springer International Publishing, 2020). doi:10.1007/978-3-030-35727-6_6.
452. Kadariya, Y. *et al.* Inflammation-Related IL1 β /IL1R Signaling Promotes the Development of Asbestos-Induced Malignant Mesothelioma. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* **9**, 406–414 (2016).
453. Mack, M. Inflammation and fibrosis. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **68–69**, 106–121 (2018).
454. Darby, I. A. & Hewitson, T. D. Hypoxia in tissue repair and fibrosis. *Cell Tissue Res.* **365**, 553–562 (2016).
455. Distler, J. H. W. *et al.* Hypoxia-induced increase in the production of extracellular matrix proteins in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **56**, 4203–4215 (2007).
456. Klominek, J. & Hauzenberger, D. Extracellular Matrix and Mesothelioma: Some Clues to the Invasive Behavior of Mesothelioma. in *Malignant Mesothelioma: Advances in Pathogenesis, Diagnosis, and Translational Therapies* (eds. Pass, H. I., Vogelzang, N. J. & Carbone, M.) 166–185 (Springer, 2005). doi:10.1007/0-387-28274-2_11.

457. Ferriola, P. C. & Stewart, W. Fibronectin expression and organization in mesothelial and mesothelioma cells. *Am. J. Physiol.* **271**, L804-812 (1996).
458. Kaarteenaho-Wiik, R., Soini, Y., Pöllänen, R., Pääkkö, P. & Kinnula, V. L. Overexpression of tenascin-C in malignant pleural mesothelioma. *Histopathology* **42**, 280–291 (2003).
459. Barkan, D., Green, J. E. & Chambers, A. F. Extracellular matrix: a gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **46**, 1181–1188 (2010).
460. Abdullah, L. N. & Chow, E. K.-H. Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clin. Transl. Med.* **2**, 3 (2013).
461. He, B., Chen, G. & Zeng, Y. Three-dimensional cell culture models for investigating human viruses. *Viol. Sin.* **31**, 363–379 (2016).
462. Hwang, K. S., Seo, E. U., Choi, N., Kim, J. & Kim, H. N. 3D engineered tissue models for studying human-specific infectious viral diseases. *Bioact. Mater.* **21**, 576–594 (2022).
463. Mondal, M., Guo, J., He, P. & Zhou, D. Recent advances of oncolytic virus in cancer therapy. *Hum. Vaccines Immunother.* **16**, 2389–2402 (2020).
464. Anderson, D. E. *et al.* Comparative Loss-of-Function Screens Reveal ABCE1 as an Essential Cellular Host Factor for Efficient Translation of Paramyxoviridae and Pneumoviridae. *mBio* **10**, e00826-19 (2019).
465. Wu, J. T., Byrne, H. M., Kirn, D. H. & Wein, L. M. Modeling and analysis of a virus that replicates selectively in tumor cells. *Bull. Math. Biol.* **63**, 731–768 (2001).
466. Berg, D. R. *et al.* In vitro and in silico multidimensional modeling of oncolytic tumor virotherapy dynamics. *PLoS Comput. Biol.* **15**, e1006773 (2019).

467. Currier, M. A., Adams, L. C., Mahller, Y. Y. & Cripe, T. P. Widespread intratumoral virus distribution with fractionated injection enables local control of large human rhabdomyosarcoma xenografts by oncolytic herpes simplex viruses. *Cancer Gene Ther.* **12**, 407–416 (2005).
468. Parato, K. A., Senger, D., Forsyth, P. A. J. & Bell, J. C. Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 965–976 (2005).
469. Sauthoff, H. *et al.* Intratumoral spread of wild-type adenovirus is limited after local injection of human xenograft tumors: virus persists and spreads systemically at late time points. *Hum. Gene Ther.* **14**, 425–433 (2003).
470. Rosellini, A. *et al.* Enhanced in vitro virus expression using 3-dimensional cell culture spheroids for infection. *J. Virol. Methods* **265**, 99–104 (2019).
471. Fang, J. Y. *et al.* From competency to dormancy: a 3D model to study cancer cells and drug responsiveness. *J. Transl. Med.* **14**, 38 (2016).
472. Barney, L. E. *et al.* Tumor cell-organized fibronectin maintenance of a dormant breast cancer population. *Sci. Adv.* **6**, eaaz4157 (2020).
473. Pranzini, E., Raugei, G. & Taddei, M. L. Metabolic Features of Tumor Dormancy: Possible Therapeutic Strategies. *Cancers* **14**, 547 (2022).
474. Molecular definitions of autophagy and related processes | The EMBO Journal. <https://www.embopress.org/doi/full/10.15252/emboj.201796697>.
475. Adusumilli, P. S. *et al.* Cisplatin-induced GADD34 upregulation potentiates oncolytic viral therapy in the treatment of malignant pleural mesothelioma. *Cancer Biol. Ther.* **5**, 48–53 (2006).
476. Gambardella, G. *et al.* GADD34 is a modulator of autophagy during starvation. *Sci. Adv.* **6**, eabb0205 (2020).

477. Zheng, K. *et al.* Epidermal Growth Factor Receptor-PI3K Signaling Controls Cofilin Activity To Facilitate Herpes Simplex Virus 1 Entry into Neuronal Cells. *mBio* **5**, e00958-13 (2014).
478. Barik, S. Respiratory syncytial virus mechanisms to interfere with type 1 interferons. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **372**, 173–191 (2013).
479. Ueki, I. F. *et al.* Respiratory virus-induced EGFR activation suppresses IRF1-dependent interferon λ and antiviral defense in airway epithelium. *J. Exp. Med.* **210**, 1929–1936 (2013).
480. Elesela, S. & Lukacs, N. W. Role of Mitochondria in Viral Infections. *Life Basel Switz.* **11**, 232 (2021).
481. Das, R. & Chakrabarti, O. Mitochondrial hyperfusion: a friend or a foe. *Biochem. Soc. Trans.* **48**, 631–644 (2020).
482. Wojton, J. & Kaur, B. Impact of tumor microenvironment on oncolytic viral therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* **21**, 127–134 (2010).
483. Keski-Oja, J., Hautanen, A. & Julkunen, I. Fibronectin and viral pathogenesis. *Rev. Infect. Dis.* **9 Suppl 4**, S404-411 (1987).
484. He, Q. *et al.* Fibronectin Facilitates Enterovirus 71 Infection by Mediating Viral Entry. *J. Virol.* **92**, e02251-17 (2018).
485. Wang, F. *et al.* Effect of fibronectin on HBV infection in primary human fetal hepatocytes in vitro. *Mol. Med. Rep.* **6**, 1145–1149 (2012).
486. Yang, J. *et al.* Fibronectin is essential for hepatitis B virus propagation in vitro: may be a potential cellular target? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **344**, 757–764 (2006).
487. Zuliani-Alvarez, L. & Piccinini, A. M. A virological view of tenascin-C in infection. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **324**, C1 (2023).

488. Waldstein, K. A. & Varga, S. M. Respiratory viruses and the inflammasome: The double-edged sword of inflammation. *PLOS Pathog.* **18**, e1011014 (2022).
489. Yang, Q. & Shu, H.-B. Deciphering the pathways to antiviral innate immunity and inflammation. *Adv. Immunol.* **145**, 1–36 (2020).
490. Kloker, L. D., Yurttas, C. & Lauer, U. M. Three-dimensional tumor cell cultures employed in virotherapy research. *Oncolytic Virotherapy* **7**, 79–93 (2018).
491. Chia, P. L., Scott, A. M. & John, T. Epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted therapies in mesothelioma. *Expert Opin. Drug Deliv.* **16**, 441–451 (2019).
492. Wong, B. *et al.* Dependency of EGFR activation in vanadium-based sensitization to oncolytic virotherapy. *Mol. Ther. - Oncolytics* **25**, 146–159 (2022).
493. Kaufman, H. L. & Bines, S. D. OPTIM trial: a Phase III trial of an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF for unresectable stage III or IV melanoma. *Future Oncol. Lond. Engl.* **6**, 941–949 (2010).
494. Weide, B., Neri, D. & Elia, G. Intralesional treatment of metastatic melanoma: a review of therapeutic options. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **66**, 647–656 (2017).
495. Stegelmeier, A. A. *et al.* Myeloid Cells during Viral Infections and Inflammation. *Viruses* **11**, 168 (2019).
496. Schäfer, S. *et al.* Vaccinia virus-mediated intra-tumoral expression of matrix metalloproteinase 9 enhances oncolysis of PC-3 xenograft tumors. *BMC Cancer* **12**, 366 (2012).
497. Zhang, T., Suryawanshi, Y. R., Szymczyna, B. R. & Essani, K. Neutralization of matrix metalloproteinase-9 potentially enhances oncolytic efficacy of tanapox virus for melanoma therapy. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* **34**, 129 (2017).

498. Setargew, Y. F. I., Wyllie, K., Grant, R. D., Chitty, J. L. & Cox, T. R. Targeting Lysyl Oxidase Family Mediated Matrix Cross-Linking as an Anti-Stromal Therapy in Solid Tumours. *Cancers* **13**, 491 (2021).
499. Perryman, L. & Gray, S. G. Fibrosis in Mesothelioma: Potential Role of Lysyl Oxidases. *Cancers* **14**, 981 (2022).
500. Zhang, C. *et al.* COL1A1 Is a Potential Prognostic Biomarker and Correlated with Immune Infiltration in Mesothelioma. *BioMed Res. Int.* **2021**, 5320941 (2021).
501. Kaushik, N., Kim, S., Suh, Y. & Lee, S.-J. Proinvasive extracellular matrix remodeling for tumor progression. *Arch. Pharm. Res.* **42**, 40–47 (2019).
502. Hyaluronan Turnover in the Extracellular Matrix (ECM) is Reduced in Human Lung Fibroblasts (HLF) Treated with the Viral Mimetic, poly I:C - Journal of Allergy and Clinical Immunology. [https://www.jacionline.org/article/S0091-6749\(07\)03174-0/fulltext](https://www.jacionline.org/article/S0091-6749(07)03174-0/fulltext).
503. Russell, S. J., Peng, K.-W. & Bell, J. C. ONCOLYTIC VIROTHERAPY. *Nat. Biotechnol.* **30**, 658–670 (2012).
504. Achard, C. *et al.* Oncolytic measles virus induces tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated cytotoxicity by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Oncoimmunology* **6**, e1261240 (2017).
505. Tang-Huau, T.-L. & Segura, E. Human in vivo-differentiated monocyte-derived dendritic cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* **86**, 44–49 (2019).
506. Tang-Huau, T.-L. *et al.* Human in vivo-generated monocyte-derived dendritic cells and macrophages cross-present antigens through a vacuolar pathway. *Nat. Commun.* **9**, 2570 (2018).

507. Bakdash, G. *et al.* Expansion of a BDCA1+CD14+ Myeloid Cell Population in Melanoma Patients May Attenuate the Efficacy of Dendritic Cell Vaccines. *Cancer Res.* **76**, 4332–4346 (2016).
508. Gerlini, G. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells represent a major dendritic cell subset in sentinel lymph nodes of melanoma patients and accumulate in metastatic nodes. *Clin. Immunol. Orlando Fla* **125**, 184–193 (2007).
509. Vermi, W. *et al.* Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas. *J. Pathol.* **200**, 255–268 (2003).
510. Sanchez David, R. Y. *et al.* Comparative analysis of viral RNA signatures on different RIG-I-like receptors. *eLife* **5**, e11275.



ANNEXES

Annexe 1 : Liste des publications et communications scientifiques

Communications

IRCI (Immune Responses in Cancer Infection) - Lyon France -2022 – Poster”
Resistance factors of thoracic cancers to oncolytic measles virus in 3D model”

IOVC (international oncolytic virus conference) - Karuizawa-machi Japon – 2022 -
Poster ”*Resistance factors of thoracic cancers to oncolytic measles virus in 3D model*”

Publications en journal avec comité de lecture :

Grard, M. et al. Reduced proliferation of mesothelioma cell lines cultured as spheroids decreases replication of oncolytic attenuated measles virus. (En preparation).

Grard, M. et al. Oncolytic attenuated measles virus encoding NY-ESO-1 induces HLA I and II presentation of this tumor antigen by melanoma and dendritic cells. (En cours de révision - *Cancer immunology and immunotherapy*).

Grard, M. et al. Homozygous Co-Deletion of Type I Interferons and Genes in Thoracic Cancers: Potential Consequences for Therapy. *Front. Oncol.* 11, 695770 (2021).

Petithomme, T., **Grard, M.**, Fonteneau, J.-F. & Boisgerault, N. Le vaccin contre la fièvre jaune : un nouveau traitement anti-tumoral ? *Med. Sci.* 36, 1216–1217 (2020).

Delaunay, T. et al. Frequent Homozygous Deletions of Type I Interferon Genes in Pleural Mesothelioma Confer Sensitivity to Oncolytic Measles Virus. *J. Thorac. Oncol.* 15, 827–842 (2020).

Jean, D. et al. Reply to: Oncolytic Viral Therapy for Malignant Pleural Mesothelioma. *J. Thorac. Oncol.* 15, (2020).

Delaunay, T. et al. High Oncolytic Activity of a Double-Deleted Vaccinia Virus Copenhagen Strain against Malignant Pleural Mesothelioma. *Molecular Therapy - Oncolytics* vol. 18 573–578 (2020).

Annexe 2 : Homozygous Co-Deletion of Type I
Interferons and CDKN2A Genes in Thoracic
Cancers: Potential Consequences for Therapy



Homozygous Co-Deletion of Type I Interferons and *CDKN2A* Genes in Thoracic Cancers: Potential Consequences for Therapy

Marion Grard^{1,2†}, Camille Chatelain^{1,2†}, Tiphaine Delaunay^{1,2}, Elvire Pons-Tostivint^{1,2,3}, Jaafar Bennouna^{1,2,3} and Jean-François Fonteneau^{1,2*}

¹ Université de Nantes, Inserm, CRCINA, Nantes, France, ² Labex IGO, Immunology Graft Oncology, Nantes, France,

³ CHU de Nantes, oncologie thoracique et digestive, Université de Nantes, Nantes, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Emanuela Felley-Bosco,
University of Zurich, Switzerland

Reviewed by:

Yoshitaka Sekido,
Aichi Cancer Center, Japan
Steven Albelda,
University of Pennsylvania,
United States

*Correspondence:

Jean-François Fonteneau
jean-francois.fonteneau@inserm.fr

[†]These authors have contributed
equally to this work and
share first authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Thoracic Oncology,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 15 April 2021

Accepted: 07 June 2021

Published: 24 June 2021

Citation:

Grard M, Chatelain C, Delaunay T,
Pons-Tostivint E, Bennouna J and
Fonteneau J-F (2021) Homozygous
Co-Deletion of Type I Interferons and
CDKN2A Genes in Thoracic Cancers:
Potential Consequences for Therapy.
Front. Oncol. 11:695770.
doi: 10.3389/fonc.2021.695770

Homozygous deletion (HD) of the tumor suppressor gene *CDKN2A* is the most frequent genetic alteration in malignant pleural mesothelioma and is also frequent in non-small cell lung cancers. This HD is often accompanied by the HD of the type I interferons (IFN I) genes that are located close to the *CDKN2A* gene on the p21.3 region of chromosome 9. IFN I genes encode sixteen cytokines (IFN- α , IFN- β ...) that are implicated in cellular antiviral and antitumor defense and in the induction of the immune response. In this review, we discuss the potential influence of IFN I genes HD on thoracic cancers therapy and speak in favor of better taking these HD into account in patients monitoring.

Keywords: lung cancer, mesothelioma, type I interferon, *CDKN2A* (p16), homozygous deletion, immunotherapy, STING

FREQUENT HOMOZYGOUS CO-DELETION OF THE *CDKN2A* TUMOR SUPPRESSOR GENE AND THE IFN I GENES IN THORACIC CANCERS

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the most common cause of cancer death worldwide often due to long-term tobacco smoking. Malignant pleural mesothelioma (MPM) is a rare cancer that is mainly due to asbestos exposure. As other cancers, some genomic alterations are found in NSCLC and MPM tumor cells, especially in locus containing tumor suppressor genes. These alterations are in part responsible for the disease.

In MPM cells, the most frequent genomic alteration is the homologous deletion (HD) in the p21.3 region of chromosome 9 (1–6). These HDs are variable in length but they mainly overlap at the level of the cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (*CDKN2A*) tumor suppressor gene located in this region (Figures 1A, B). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) studies reported that *CDKN2A* gene HDs are found in 60 to 80% of patients (3–6). Copy number alteration study from The Cancer Genome Atlas (TCGA) reported a lower frequency of 44% of patients with *CDKN2A* gene HD in MPM (Figure 1B) (7). However, TCGA study is performed on tumor biopsies that often contain non-malignant cells. These non-malignant cells may mask *CDKN2A* gene HD that are only present in tumor cells. Thus, some patients with *CDKN2A* gene HD were probably not detected in the TCGA study.

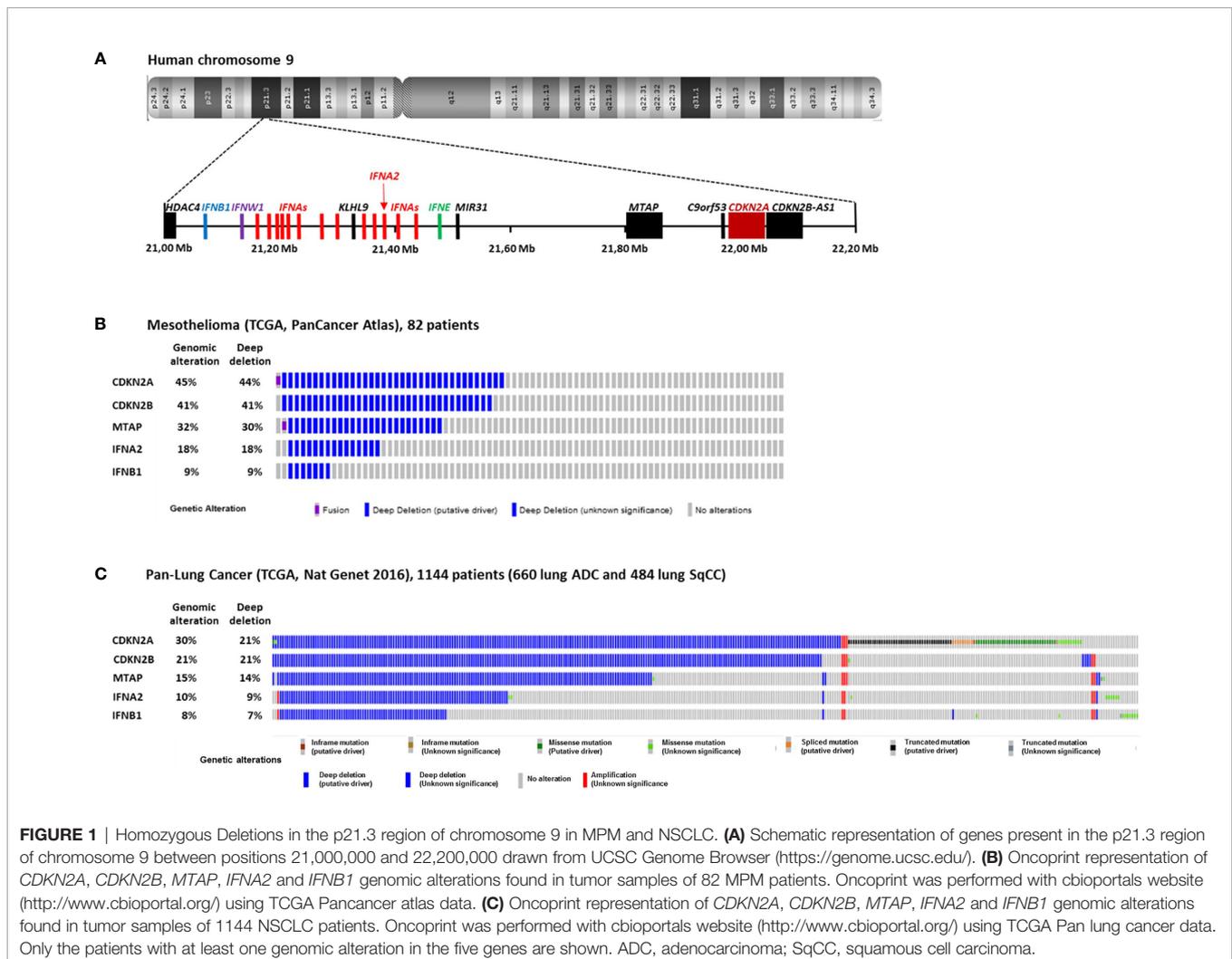
In NSCLC, *CDKN2A* gene HDs were also identified in the 1990s (8–10). They were then found more frequently in a subset of patient with intact retinoblastoma (*rb*) pathway (11). FISH studies on 85 and 19 NSCLC patients reported *CDKN2A* gene HD in 21 and 29% of patients respectively (12, 13), and FISH study on 31 squamous cell carcinoma (SqCC) patients reported them in 16% (14). TCGA study on 1144 NSCLC patients (660 lung adenocarcinoma and 484 lung SqCC) reported *CDKN2A* gene HD in 21% of patients (**Figure 1C**) (15).

The *CDKN2A* gene encodes several proteins, notably p16^{INK4a} and p14^{arf} that are implicated in the regulation of the cell cycle. p16^{INK4a} binds to cyclin-dependent kinase 4 and 6 (CDK4/6) and inhibits its capacity with cyclin D1 to phosphorylate *rb* protein and the translocation of the transcription factor E2F from the cytoplasm to the nucleus (16). In absence of p16^{INK4a}, E2F translocates to the nucleus and allows the transition from G1 phase to S phase of the cell cycle. p14^{arf} also acts as a tumor suppressor *via* the p53 pathway and its absence favors the entry in the cell cycle.

Close to *CDKN2A* gene, *CDKN2B* and *MTAP* are two other genes that are often co-deleted with *CDKN2A* in MPM

(**Figure 1B**) and NSCLC (**Figure 1C**). *CDKN2B* encode the p15^{Ink4b} protein that interacts with CDK4/6 and inhibits its activation by cyclin D and thus acts as a tumor suppressor (17). *MTAP* encodes the S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase (MTAP) implicated in the polyamine metabolism (18).

Further downstream from *CDKN2A* and *MTAP* in the p21.3 region of human chromosome 9, a cluster of 16 genes encodes the type I interferons (IFN I): IFN- β , IFN- ϵ , IFN- ω and 13 IFN- α (**Figure 1A**) (19). *IFNB1* is the furthest gene from *CDKN2A*. In the 1990s, IFN I genes HDs were identified in a fraction of NSCLC and MPM patients with *CDKN2A* gene HD (1, 2, 8, 20). We recently reported that in 78 short-term-cultured MPM cell lines, 57 (73%) and 18 (23%) cell lines harbors *CDKN2A* and *IFNB1* genes HD respectively, whereas in TCGA study performed on 82 patients, these percentage were smaller, probably due to non-malignant cells contamination (44 and 9%) (**Figure 1B**) (21). Thus, about 10 to 20% of mesothelioma patients present HD of all the IFN I genes. In NSCLC, the TCGA study on 1,144 patients reported 21 and 7% of patients with *CDKN2A* and *IFNB1* gene HDs respectively (**Figure 1C**). Interestingly, NSCLC patients with IFN I and *CDKN2A* gene



HDs have a significantly worse disease free survival than patients with only *CDKN2A* gene HD (22), suggesting a tumor suppressor role for IFN I genes in this cancer.

THE TYPE I INTERFERON RESPONSE IN THORACIC CANCERS

Type I interferon (IFN I) response is key in antiviral immune response (Figure 2). The IFN I response allows infected and immune cells to report *via* IFN- α and - β secretion the presence of the virus to neighboring cells and to the immune system *via* the IFN- α /- β receptor (IFNAR) which is expressed by virtually all somatic cells (23). The presence of viral genome or intermediaries of its replication is detected by cytoplasmic pattern recognition receptors (PRR) and lead to the production of IFN I *via* two main pathways: the stimulator of interferon genes protein (STING) pathway for DNA viruses and the mitochondrial antiviral-signaling protein (MAVS) pathway for RNA viruses (23, 24). IFN I are also produced by immune cells notably *via* Toll like receptor (TLR) activation, especially plasmacytoid dendritic cells (pDC) (25). IFN- β is expressed by all nucleated cells in response to infection, whereas the IFN- α are mainly produced by immune cells. Among IFN- α , IFN- α 2 was

the first cytokines to be approved in clinics for cancer treatment in 1986 and is the most studied (26).

Cells exposed to IFN I express hundreds of IFN-stimulated genes (ISGs). Many ISGs encode proteins that induce a state of anti-viral resistance. These antiviral proteins act 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 (23, 27). The IFN I also play a crucial role in the induction and the regulation of the antiviral adaptive immune response, notably by favoring antigen cross-priming by dendritic cells (28, 29). However, during chronic infection, prolonged IFN I response can have deleterious effects by inducing immune dysfunctions (30).

IFN I response is often induced during cancer development and treatments. Several pathways are involved in this induction. Presence of mitochondrial or nuclear DNA in the cytoplasm of tumor cells can induce the secretion of IFN I *via* the STING pathway (31–39). Expression of endogenous retrovirus (ERV) under the form of dsRNA due to epigenetic deregulation in tumor cells can also trigger the expression of IFN I *via* the MAVS pathway (35, 40–44). Non-malignant cells from the tumor microenvironment, such as phagocytic cells notably dendritic cells (DC), can also produce IFN I *via* activation of the STING pathway after engulfment of dead tumor cells. This occurs due to

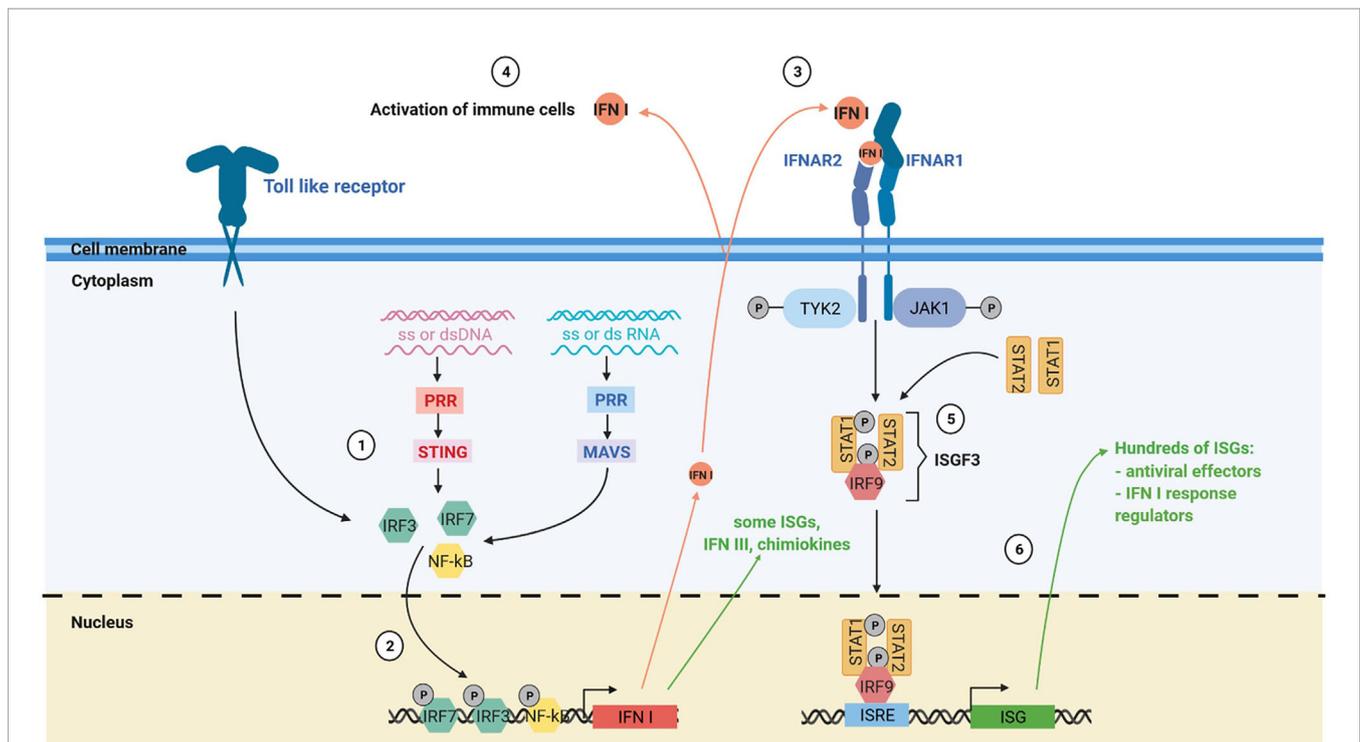


FIGURE 2 | The IFN I response. (1) The IFN I response is triggered by different stimuli such as ssDNA, dsDNA, ssRNA and dsRNA *via* the toll like receptors, the MAVS and the STING pathway. (2) Activation of these pathways induces the nuclear translocation of transcription factors such as IRF3, IRF7 and NF- κ B that trigger IFN I production and expression of some interferon stimulated genes (ISGs). (3) Secreted IFN I trigger IFNAR signaling on neighboring cells, notably immune cells. (4) IFN I and other soluble factors of the IFN I response activate the immune response. (5) Activation of IFNAR signaling by IFN I leads to the formation of the interferon stimulated gene factor 3 complex. (6) This complex translocates to the nucleus and activates numerous ISGs with antiviral, immunomodulatory and regulatory functions. PRR, pattern recognition receptors.

accumulation of DNA from engulfed dead tumor cells in DC cytoplasm (39, 45–47). A recent analysis of 31 cancer types in TCGA database by Liu et al. shows that, lung adenocarcinoma, MPM and SqCC are the 3rd, 6th and 8th respectively in the intensity of an IFN I signature based on the expression of 38 ISGs (35). Globally, IFN I signature correlates with the degree of immune cells infiltration, but some tumors with an interferon signature and with no immune cells infiltration were also found.

IFN I signaling is able to modulate the expressions of hundreds of genes (27). This signaling pathway also induces expression of noncoding RNAs including long noncoding RNAs, miRNA and ERV RNA (27, 41, 48). Due to its potential toxicity and inflammatory effects, IFN I production and signaling are tightly regulated by numerous positive and negative regulators, many of which are ISGs (49). Thus, induction of IFN I response in tumors has multiple complex effects that are rather unfavorable to tumor development. The IFN I can restrict tumor growth by reducing proliferation of tumor cells, inducing their apoptosis, limiting their migratory capacity and inhibiting angiogenesis (50, 51). Furthermore, they increase antigen presentation by HLA molecules, stimulate the innate and adaptive antitumor immune response and inhibit CD4⁺ regulatory T cells (30, 50, 52–56). IFN I were shown to play an important role in tumor immuno-editing in mouse models of chemically-induced and transposable tumors (57). They signal tumor cells to the immune system. They are necessary for the priming of anti-tumor T cell response as the abrogation of IFN I signaling in CD8⁺ dendritic cells blocks their capacity to cross-present antigens in mouse (54, 55). They also participate in the activation of anti-tumor NK cell response (56). Induction of anti-tumor NK and T cell responses lead to the secretions of the type II interferon-gamma (IFN- γ) that will further shapes the immunogenicity and the immunosuppressive microenvironment of the tumor with the IFN I (58). Indeed, IFN I are also involved in setting up the immunosuppressive tumor environment by inducing the expression of numerous inhibitory molecules such as PD1 and PDL1 that block CD8⁺ T cell cytotoxicity (30, 50, 58). IFN I can also induce Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression that reduces locally the amount of tryptophan needed for T cell functions and favors their differentiation in Treg (59). Thus, the IFN I in tumors play a dual role by stimulating the innate and adaptive immune response and inducing feedback mechanisms to control its magnitude.

IFN I in NSCLC modulates numerous pathways implicated in proliferation, survival and apoptosis of tumor cells including JAK/STAT, Src kinases, Vav proto-oncogene, PTEN/PI3-K/AKT, Crk proteins and MAP kinase signaling pathways (51). Several recent studies reported that a constitutive activation of the IFN I response in lung tumors correlates with tumor inflammation and immune checkpoint inhibitors efficacy (60–62). Furthermore, DNA damages and dysfunctions of the DNA damage response are inducers of the IFN I response and have been linked to immune checkpoint efficiency (37, 63). The renewed interest in IFN I response also comes from the observation that they are necessary for the radiotherapy abscopal response (64–67), and that they participate in the induction of the antitumor immune response by chemotherapy

(68). This is also due to the identification of new potential immune checkpoint such as ADAR and Trex1 which are ISG that functions as negative regulators of the IFN I response by inactivating the nucleic acids that stimulate this response (35, 40, 65, 66). By blocking ADAR or Trex function, IFN I response is amplified which promotes the antitumor immune response. Thus, there is still a great interest to adapt treatments or find new therapeutic strategies to activate the IFN I response locally especially in cold tumors with no or low immune cells infiltrate.

POTENTIAL CONSEQUENCES OF IFN I GENES HD FOR THORACIC CANCERS THERAPY

Given the central role of IFN I response in tumor immune surveillance, the frequent loss of all copies of IFN I genes that accompanied *CDKN2A* gene HD in tumor cells likely plays a role in tumor immune escape. In NSCLC, like in other cancers, patients with only *CDKN2A* gene HD have a longer survival compared to patients with IFN I and *CDKN2A* genes HD (22). Thus, IFN I genes act as tumor suppressors genes in malignant cells. Beside this study of Ye et al., nothing is known on the prognostic value and immunotherapy biomarker potential of IFN I genes HD in NSCLC, MPM and other cancers. These deletions were described as early as the mid-1990s and yet they have not been well documented. It may be because they were discovered in studies focusing on the *CDKN2A* tumor suppressor gene HD. Furthermore, reports that IFN I treatment in NSCLC and MPM has limited clinical benefit at that time, may have decrease the interest of studying IFN I gene HD. Finally, most studies on the role of IFN I on antitumor immune response were performed with IFNARko mouse models that are easier to obtain than mouse models ko for all IFN I genes. These IFNARko models are instrumental to understand the role of IFN I signaling on tumor cells and the different subtypes of immune cells but are less suitable to study the source of the IFN I production.

Questions arise regarding presence of IFN I genes HD in tumor cells. There are several potential cellular sources of IFN I secretion in tumors, that are basically tumor and immune cells. Thus, the first question is the role of IFN I production by tumor cells and if absence of this production is compensated by other cellular sources. Several recent studies suggest that triggering of the tumor cells IFN I production play a role in the induction of the anti-tumor immune response.

Kitajima et al. reported that the lack of response to immune checkpoint blockade (ICB) of patients with KRAS-LKB1-mutant lung cancers is due to the inhibition of STING expression *via* the loss of LKB1 (62). They show that KRAS-LKB1-mutant tumor cells are not able to sense cytoplasmic dsDNA *via* the STING pathway, and to produce IFN I in response. In consequence, T cells infiltration and PD-L1 expression in KRAS-LKB1-mutant tumors is reduced and ICB therapy is ineffective.

Demaria's team showed that triggering of tumor cell IFN I response is necessary for induction of anti-tumor immune

response by radiotherapy (64, 65). They first reported that abscopal response in mouse is abrogated when cancer cells in the irradiated tumor do not express cGAS/STING or overexpress the exonuclease Trex1 (65). Irradiation induces the presence of cytoplasmic DNA that triggers the IFN- β production *via* the STING pathway and lead to the expression of the ISG Trex1. This ISG is an exonuclease that degrades DNA in the cytoplasm and thus decreases IFN I response by tumor cells and triggering of the antitumor immune response. By inactivating Trex1 in tumor cells, the IFN I response induced by irradiation is increased, as well as the antitumor immune response. Thus, tumor cell IFN I response is essential for abscopal effect of radiation in that mouse model. Demaria's team then showed that combination of radiotherapy and anti-CTLA4 blockade in NSCLC patients that have failed anti-CTLA4 alone or in combination with chemotherapy, induced IFN- β in the blood and an antitumor T cell response in responding patients (64).

These studies highlight the important role on the antitumor immune response of triggering the IFN I response *via* the STING pathway in tumor cells. However, IFN I response in tumor cells can also be induced by the sensing of endogenous dsRNA *via* the MAVS pathway and that also plays a role in the stimulation of the antitumor immune response (35, 40–44). Best evidences come from the study of an ISG, the adenosine deaminase acting on RNA (ADAR) that acts on the MAVS pathway like Trex1 does on the STING pathway (35, 40). The ADAR protein, by converting A to I, disrupts the normal A:U pairing which destabilizes the dsRNA into ssRNA. dsRNA edited by ADAR are no longer able to trigger the IFN I response by the dsRNA cytoplasmic sensor Mda5. Thus like Trex1, ADAR inactivates the stimuli at the origin of the IFN I production by tumor cells. In a mouse model, Ishizuka et al. reported that loss of *ADAR1* in tumor cells overcomes the resistance to immune checkpoint inhibitors by increasing the IFN I response *via* the MAVS pathway and, thus, the inflammation of the tumor microenvironment (40). This results was confirmed by Liu et al., that show that both, the MAVS and the STING pathway are needed to maintain the IFN I response in tumor cells that have lost ADAR (35).

Altogether these studies on the STING and the MAVS pathway show that triggering of the IFN I response in tumor cells is central to inflame the microenvironment. However, it does not establish clearly that IFN I production by tumor cells is required. Indeed, in these studies, the MAVS or the STING pathway is inactivated. This inactivation impairs IFN I production and also the expression of lots of other genes. Indeed, when the MAVS or the STING pathway are triggered, activated transcription factors such as IRF3 and NF- κ B not only induce IFN I production, but also the expression of many other genes with many being ISG (**Figure 2**). In MPM cell lines that have lost IFN I genes, exposition to attenuated measles virus still resulted in the induction of expression of a small subset of genes (21). Among these genes, some may play a role in the inflammation of the microenvironment, such as the chemokines CCL5, CXCL10 and CXCL11, or the type III interferons. Thus, triggering of the IFN I response in tumor cells

that have lost IFN I genes may still conserve a certain capacity to inflame the microenvironment. By studying patients with IFN I genes HD tumors, we would better understand the IFN I contribution of tumor cells versus non-malignant cells in cancer development and therapies. We would also better define the contribution of IFN I versus other cytokines/chemokines induced by the triggering of the MAVS or the STING pathway.

IFN I genes HD may also be interesting for new cancer therapies such as antitumor virotherapy using oncolytic replicative viruses. We studied the replication and oncolytic activity of the attenuated Schwarz strain of measles virus (MV) on 22 human MPM cell lines and four types of healthy cell (fibroblasts, mesothelial, endothelial and lung epithelial cells) (69). We found that the healthy cells and seven MPM cell lines were resistant to MV replication due to a protective functional IFN I response. The 15 others MPM cell lines were permissive to MV replication and lysis due to a defective IFN I response. Among these 15 cell lines, 11 were unable to produce IFN I when exposed to MV. We showed later that eight of these 11 cell lines have lost both copies of the IFN I genes (21). The three others cells line have at least one copy of IFN I genes but are not able to produce IFN I in response to the virus suggesting another type of defects of the IFN I response in these MPM cells lines (69). These 11 MV-sensitive MPM cell lines that are unable to produce IFN I in response to MV become MV-resistant if exposed to exogenous IFN I, suggesting that IFNAR signaling is functional in these cell lines. The four other MV-sensitive MPM cell lines were able to produce IFN I in response to MV, but unable to control viral replication suggesting a defect of the IFN I response in IFNAR signaling. This defective IFNAR signaling has been previously reported in tumor cells of some patients with MPM (70). It has been associated to mark decrease of IFNAR, IRF9 and PKR expression and to tumor sensitivity to an oncolytic vesicular stomatitis virus. These studies illustrate the diversity of defects found in the IFN I response from one patients to another in MPM. Such converging selection of tumor cells with a deficient IFN I response highlights the tumor suppressive role of this response.

Other questions are still pending regarding IFN I genes HD. These HD are diverse in length (**Figure 2**). For some patients, only a part of IFN I genes are lost and *IFNB1* gene that encodes IFN- β is preserved (**Figure 1**). Consequences of these partial losses are also to define. During tumor development, do these HD appear concomitantly to *CDKN2A* HD or do they appear later conferring an additional advantage to the tumor variant that carries them? The best techniques for detecting IFN I genes HD is probably FISH assay that can be performed cost effectively on paraffin-embedded tissue and allow to identify homozygous and hemizygous deletions at the single cell level (71). It can also be performed by polymerase chain reaction-based techniques or whole exome sequencing on tumor biopsies, but large amount of non-malignant cells in the biopsy may hide the deletions.

With the success of cancer immunotherapy and recent advances in understanding the IFN I tumor suppressor role, IFN I genes HD should be studied and taken into account in the monitoring of MPM and NSCLC patients. This would likely lead to new strategies and improvements of immunotherapy.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Literature review: MG, CC, and JFF. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by “La Ligue Régionale Grand Ouest contre le Cancer” (CSIRGO: CD16, CD22, CD44, CD49, CD72, CD79 and CD85), “La Ligue Nationale contre le Cancer”, “L’association ARSMESO44”, “La fondation ARC”, L’Agence

Nationale pour la Recherche (ANR-16-CE18-0016), and “LabEX IGO program supported by the National Research Agency via the investment of the future program ANR-11-LABX-0016-01”. TD was supported by a grant from Ligue contre le Cancer.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Didier Jean for his insightful discussion. **Figure 2** was created with BioRender.com.

REFERENCES

- Cheng JQ, Jhanwar SC, Klein WM, Bell DW, Lee WC, Altomare DA, et al. p16 Alterations and Deletion Mapping of 9p21-p22 in Malignant Mesothelioma. *Cancer Res* (1994) 54(21):5547–51.
- Xio S, Li D, Vijg J, Sugarbaker DJ, Corson JM, Fletcher JA. Codeletion of p15 and p16 in Primary Malignant Mesothelioma. *Oncogene* (1995) 11(3):511–5.
- Cheng YY, Yuen ML, Rath EM, Johnson B, Zhuang L, Yu TK, et al. CDKN2A and MTAP Are Useful Biomarkers Detectable by Droplet Digital PCR in Malignant Pleural Mesothelioma: A Potential Alternative Method in Diagnosis Compared to Fluorescence in Situ Hybridisation. *Front Oncol* (2020) 10:579327. doi: 10.3389/fonc.2020.579327
- Illei PB, Rusch VW, Zakowski MF, Ladanyi M. Homozygous Deletion of CDKN2A and Codeletion of the Methylthioadenosine Phosphorylase Gene in the Majority of Pleural Mesotheliomas. *Clin Cancer Res* (2003) 9(6):2108–13.
- Hwang HC, Sheffield BS, Rodriguez S, Thompson K, Tse CH, Gown AM, et al. Utility of BAP1 Immunohistochemistry and p16 (Cdkn2a) FISH in the Diagnosis of Malignant Mesothelioma in Effusion Cytology Specimens. *Am J Surg Pathol* (2016) 40(1):120–6. doi: 10.1097/PAS.0000000000000529
- Marshall K, Jackson S, Jones J, Holme J, Lyons J, Barrett E, et al. Homozygous Deletion of CDKN2A in Malignant Mesothelioma: Diagnostic Utility, Patient Characteristics and Survival in a UK Mesothelioma Centre. *Lung Cancer* (2020) 150:195–200. doi: 10.1016/j.lungcan.2020.10.020
- Hmeljak J, Sanchez-Vega F, Hoadley KA, Shih J, Stewart C, Heiman D, et al. Integrative Molecular Characterization of Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancer Discovery* (2018) 8(12):1548–65. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0804
- Dreyling MH, Bohlander SK, Adeyanju MO, Olopade OI. Detection of CDKN2 Deletions in Tumor Cell Lines and Primary Glioma by Interphase Fluorescence in Situ Hybridization. *Cancer Res* (1995) 55(5):984–8.
- Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, et al. A Cell Cycle Regulator Potentially Involved in Genesis of Many Tumor Types. *Science* (1994) 264(5157):436–40. doi: 10.1126/science.8153634
- Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the Cyclin-Dependent Kinase-4 Inhibitor Gene in Multiple Human Cancers. *Nature* (1994) 368(6473):753–6. doi: 10.1038/368753a0
- Shapiro GI, Edwards CD, Kobzik L, Godleski J, Richards W, Sugarbaker DJ, et al. Reciprocal Rb Inactivation and p16INK4 Expression in Primary Lung Cancers and Cell Lines. *Cancer Res* (1995) 55(3):505–9.
- Okami K, Cairns P, Westra WH, Linn JF, Ahrendt SA, Wu L, et al. Detailed Deletion Mapping at Chromosome 9p21 in Non-Small Cell Lung Cancer by Microsatellite Analysis and Fluorescence in Situ Hybridization. *Int J Cancer* (1997) 74(6):588–92. doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19971219)74:6<588::aid-ijc5>3.0.co;2-q
- Panani AD, Maliaga K, Babanaraki A, Bellenis I. Numerical Abnormalities of Chromosome 9 and p16CDKN2A Gene Deletion Detected by FISH in non-Small Cell Lung Cancer. *Anticancer Res* (2009) 29(11):4483–7.
- Dessy E, Rossi E, Berenzi A, Tironi A, Benetti A, Grigolato P. Chromosome 9 Instability and Alterations of p16 Gene in Squamous Cell Carcinoma of the Lung and in Adjacent Normal Bronchi: FISH and Immunohistochemical Study. *Histopathology* (2008) 52(4):475–82. doi: 10.1111/j.1365-2559.2008.02969.x
- Campbell JD, Alexandrov A, Kim J, Wala J, Berger AH, Pedamallu CS, et al. Distinct Patterns of Somatic Genome Alterations in Lung Adenocarcinomas and Squamous Cell Carcinomas. *Nat Genet* (2016) 48(6):607–16. doi: 10.1038/ng.3564
- Burkhardt DL, Sage J. Cellular Mechanisms of Tumour Suppression by the Retinoblastoma Gene. *Nat Rev Cancer* (2008) 8(9):671–82. doi: 10.1038/nrc2399
- Kim WY, Sharpless NE. The Regulation of INK4/ARF in Cancer and Aging. *Cell* (2006) 127(2):265–75. doi: 10.1016/j.cell.2006.10.003
- Urso L, Cavallari I, Sharova E, Ciccarese F, Pasello G, Ciminale V. Metabolic Rewiring and Redox Alterations in Malignant Pleural Mesothelioma. *Br J Cancer* (2020) 122(1):52–61. doi: 10.1038/s41416-019-0661-9
- Diaz MO. The Human Type I Interferon Gene Cluster. *Semin Virol* (1995) 6(3):143–9. doi: 10.1006/smvy.1995.0019
- Mead LJ, Gillespie MT, Irving LB, Campbell LJ. Homozygous and Hemizygous Deletions of 9p Centromeric to the Interferon Genes in Lung Cancer. *Cancer Res* (1994) 54(9):2307–9.
- Delaunay T, Achard C, Boisgerault N, Grard M, Petithomme T, Chatelain C, et al. Frequent Homozygous Deletions of Type I Interferon Genes in Pleural Mesothelioma Confer Sensitivity to Oncolytic Measles Virus. *J Thorac Oncol* (2020) 15(5):827–42. doi: 10.1016/j.jtho.2019.12.128
- Ye Z, Dong H, Li Y, Ma T, Huang H, Leong HS, et al. Prevalent Homozygous Deletions of Type I Interferon and Defensin Genes in Human Cancers Associate With Immunotherapy Resistance. *Clin Cancer Res* (2018) 24(14):3299–308. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3008
- Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annu Rev Immunol* (2014) 32:513–45. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120231
- Iwasaki A. A Virological View of Innate Immune Recognition. *Annu Rev Microbiol* (2012) 66:177–96. doi: 10.1146/annurev-micro-092611-150203
- Brubaker SW, Bonham KS, Zanon I, Kagan JC. Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. *Annu Rev Immunol* (2015) 33:257–90. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112240
- Paul F, Pellegrini S, Uze G. Ifna2: The Prototypic Human Alpha Interferon. *Gene* (2015) 567(2):132–7. doi: 10.1016/j.gene.2015.04.087
- Schoggins JW. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All do? *Annu Rev Virol* (2019) 6(1):567–84. doi: 10.1146/annurev-virology-092818-015756
- Crouse J, Kalinke U, Oxenius A. Regulation of Antiviral T Cell Responses by Type I Interferons. *Nat Rev Immunol* (2015) 15(4):231–42. doi: 10.1038/nri3806
- Schiavoni G, Mattei F, Gabriele L. Type I Interferons as Stimulators of DC-Mediated Cross-Priming: Impact on Anti-Tumor Response. *Front Immunol* (2013) 4:483. doi: 10.3389/fimmu.2013.00483
- Snell LM, McGaha TL, Brooks DG. Type I Interferon in Chronic Virus Infection and Cancer. *Trends Immunol* (2017) 38(8):542–57. doi: 10.1016/j.it.2017.05.005
- Mackenzie KJ, Carroll P, Martin CA, Murina O, Fluteau A, Simpson DJ, et al. cGAS Surveillance of Micronuclei Links Genome Instability to Innate Immunity. *Nature* (2017) 548(7668):461–5. doi: 10.1038/nature23449

32. McArthur K, Whitehead LW, Heddleston JM, Li L, Padman BS, Oorschot V, et al. BAK/BAX Macropores Facilitate Mitochondrial Herniation and mtDNA Efflux During Apoptosis. *Science* (2018) 359(6378):eaao6047. doi: 10.1126/science.aao6047
33. Harding SM, Benci JL, Irianto J, Discher DE, Minn AJ, Greenberg RA. Mitotic Progression Following DNA Damage Enables Pattern Recognition Within Micronuclei. *Nature* (2017) 548(7668):466–70. doi: 10.1038/nature23470
34. Marcus A, Mao AJ, Lensink-Vasan M, Wang L, Vance RE, Raulet DH. Tumor-Derived Cgamp Triggers a STING-Mediated Interferon Response in Non-Tumor Cells to Activate the NK Cell Response. *Immunity* (2018) 49(4):754–63.e4. doi: 10.1016/j.immuni.2018.09.016
35. Liu H, Golji J, Brodeur LK, Chung FS, Chen JT, deBeaumont RS, et al. Tumor-Derived IFN Triggers Chronic Pathway Agonism and Sensitivity to ADAR Loss. *Nat Med* (2019) 25(1):95–102. doi: 10.1038/s41591-018-0302-5
36. Vanpouille-Box C, Demaria S, Formenti SC, Galluzzi L. Cytosolic DNA Sensing in Organismal Tumor Control. *Cancer Cell* (2018) 34(3):361–78. doi: 10.1016/j.ccell.2018.05.013
37. Mouw KW, Goldberg MS, Konstantinopoulos PA, D'Andrea AD. Dna Damage and Repair Biomarkers of Immunotherapy Response. *Cancer Discovery* (2017) 7(7):675–93. doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-0226
38. Yamazaki T, Kirchmair A, Sato A, Buque A, Rybstein M, Petroni G, et al. Mitochondrial DNA Drives Abscopal Responses to Radiation That Are Inhibited by Autophagy. *Nat Immunol* (2020) 21(10):1160–71. doi: 10.1038/s41590-020-0751-0
39. Ahn J, Xia T, Konno H, Konno K, Ruiz P, Barber GN. Inflammation-Driven Carcinogenesis is Mediated Through STING. *Nat Commun* (2014) 5:5166. doi: 10.1038/ncomms6166
40. Ishizuka JJ, Manguso RT, Cheruyiot CK, Bi K, Panda A, Iracheta-Velhe A, et al. Loss of ADAR1 in Tumours Overcomes Resistance to Immune Checkpoint Blockade. *Nature* (2019) 565(7737):43–8. doi: 10.1038/s41586-018-0768-9
41. Canadas I, Thummalapalli R, Kim JW, Kitajima S, Jenkins RW, Christensen CL, et al. Tumor Innate Immunity Primed by Specific Interferon-Stimulated Endogenous Retroviruses. *Nat Med* (2018) 24(8):1143–50. doi: 10.1038/s41591-018-0116-5
42. Panda A, de Cubas AA, Stein M, Riedlinger G, Kra J, Mayer T, et al. Endogenous Retrovirus Expression is Associated With Response to Immune Checkpoint Blockade in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *JCI Insight* (2020) 5(11):e137569. doi: 10.1172/jci.insight.121522
43. Roulois D, Loo Yau H, Singhania R, Wang Y, Danesh A, Shen SY, et al. Dna-Demethylating Agents Target Colorectal Cancer Cells by Inducing Viral Mimicry by Endogenous Transcripts. *Cell* (2015) 162(5):961–73. doi: 10.1016/j.cell.2015.07.056
44. Sun S, Frontini F, Qi W, Hariharan A, Ronner M, Wipplinger M, et al. Endogenous Retrovirus Expression Activates Type-I Interferon Signaling in an Experimental Mouse Model of Mesothelioma Development. *Cancer Lett* (2021) 507:26–38. doi: 10.1016/j.canlet.2021.03.004
45. Woo SR, Fuertes MB, Corrales L, Spranger S, Furdyna MJ, Leung MY, et al. STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Mediates Innate Immune Recognition of Immunogenic Tumors. *Immunity* (2014) 41(5):830–42. doi: 10.1016/j.immuni.2014.10.017
46. Barber GN. STING: Infection, Inflammation and Cancer. *Nat Rev Immunol* (2015) 15(12):760–70. doi: 10.1038/nri3921
47. Xu MM, Pu Y, Han D, Shi Y, Cao X, Liang H, et al. Dendritic Cells But Not Macrophages Sense Tumor Mitochondrial DNA for Cross-priming Through Signal Regulatory Protein Alpha Signaling. *Immunity* (2017) 47(2):363–73.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2017.07.016
48. Suarez B, Prats-Mari L, Unfried JP, Fortes P. LncRNAs in the Type I Interferon Antiviral Response. *Int J Mol Sci* (2020) 21(17):6447. doi: 10.3390/ijms21176447
49. Arimoto KI, Miyauchi S, Stoner SA, Fan JB, Zhang DE. Negative Regulation of Type I IFN Signaling. *J Leukoc Biol* (2018) 103:1099–116. doi: 10.1002/JLB.2MIR0817-342R
50. Zhou L, Zhang Y, Wang Y, Zhang M, Sun W, Dai T, et al. A Dual Role of Type I Interferons in Antitumor Immunity. *Adv Biosyst* (2020) 4(11):e1900237. doi: 10.1002/adbi.201900237
51. Galani V, Kastamoulas M, Varouktsi A, Lampri E, Mitselou A, Arvanitis DL. Ifns-Signaling Effects on Lung Cancer: An Up-to-Date Pathways-Specific Review. *Clin Exp Med* (2017) 17(3):281–9. doi: 10.1007/s10238-016-0432-3
52. Zitvogel L, Galluzzi L, Kepp O, Smyth MJ, Kroemer G. Type I Interferons in Anticancer Immunity. *Nat Rev Immunol* (2015) 15(7):405–14. doi: 10.1038/nri3845
53. Vidal P. Interferon Alpha in Cancer Immunoeediting: From Elimination to Escape. *Scand J Immunol* (2020) 91(5):e12863. doi: 10.1111/sji.12863
54. Diamond MS, Kinder M, Matsushita H, Mashayekhi M, Dunn GP, Archambault JM, et al. Type I Interferon is Selectively Required by Dendritic Cells for Immune Rejection of Tumors. *J Exp Med* (2011) 208(10):1989–2003. doi: 10.1084/jem.20101158
55. Fuertes MB, Kacha AK, Kline J, Woo SR, Kranz DM, Murphy KM, et al. Host Type I IFN Signals are Required for Antitumor CD8+ T Cell Responses Through CD8 α + Dendritic Cells. *J Exp Med* (2011) 208(10):2005–16. doi: 10.1084/jem.20101159
56. Swann JB, Hayakawa Y, Zerafa N, Sheehan KC, Scott B, Schreiber RD, et al. Type I IFN Contributes to NK Cell Homeostasis, Activation, and Antitumor Function. *J Immunol* (2007) 178(12):7540–9. doi: 10.4049/jimmunol.178.12.7540
57. Dunn GP, Bruce AT, Sheehan KC, Shankaran V, Uppaluri R, Bui JD, et al. A Critical Function for Type I Interferons in Cancer Immunoeediting. *Nat Immunol* (2005) 6(7):722–9. doi: 10.1038/nri213
58. Benci JL, Xu B, Qiu Y, Wu TJ, Dada H, Twyman-Saint Victor C, et al. Tumor Interferon Signaling Regulates a Multigenic Resistance Program to Immune Checkpoint Blockade. *Cell* (2016) 167(6):1540–54.e12. doi: 10.1016/j.cell.2016.11.022
59. Lemos H, Mohamed E, Huang L, Ou R, Pacholczyk G, Arbab AS, et al. Sting Promotes the Growth of Tumors Characterized by Low Antigenicity Via IDO Activation. *Cancer Res* (2016) 76(8):2076–81. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1456
60. Della Corte CM, Sen T, Gay CM, Ramkumar K, Diao L, Cardnell RJ, et al. Sting Pathway Expression Identifies Nsclc With an Immune-Responsive Phenotype. *J Thorac Oncol* (2020) 15(5):777–91. doi: 10.1016/j.jtho.2020.01.009
61. Thompson JC, Hwang WT, Davis C, Deshpande C, Jeffries S, Rajpurohit Y, et al. Gene Signatures of Tumor Inflammation and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) Predict Responses to Immune Checkpoint Blockade in Lung Cancer With High Accuracy. *Lung Cancer* (2020) 139:1–8. doi: 10.1016/j.lungcan.2019.10.012
62. Kitajima S, Ivanova E, Guo S, Yoshida R, Campisi M, Sundararaman SK, et al. Suppression of STING Associated With LKB1 Loss in KRAS-Driven Lung Cancer. *Cancer Discovery* (2019) 9(1):34–45. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0689
63. Ricciuti B, Recondo G, Spurr LF, Li YY, Lamberti G, Venkatraman D, et al. Impact of DNA Damage Response and Repair (Ddr) Gene Mutations on Efficacy of PD-(L)1 Immune Checkpoint Inhibition in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* (2020) 26(15):4135–42. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3529
64. Formenti SC, Rudqvist NP, Golden E, Cooper B, Wennerberg E, Lhuillier C, et al. Radiotherapy Induces Responses of Lung Cancer to CTLA-4 Blockade. *Nat Med* (2018) 24(12):1845–51. doi: 10.1038/s41591-018-0232-2
65. Vanpouille-Box C, Alard A, Aryankalayil MJ, Sarfarz Y, Diamond JM, Schneider RJ, et al. DNA Exonuclease Trex1 Regulates Radiotherapy-Induced Tumour Immunogenicity. *Nat Commun* (2017) 8:15618. doi: 10.1038/ncomms15618
66. Diamond JM, Vanpouille-Box C, Spada S, Rudqvist NP, Chapman JR, Ueberheide BM, et al. Exosomes Shuttle Trex1-Sensitive IFN-Stimulatory dsDNA From Irradiated Cancer Cells to Dcs. *Cancer Immunol Res* (2018) 6(8):910–20. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0581
67. Skoulidis F, Goldberg ME, Greenawalt DM, Hellmann MD, Awad MM, Gainor JF, et al. Stk11/Lkb1 Mutations and PD-1 Inhibitor Resistance in KRAS-Mutant Lung Adenocarcinoma. *Cancer Discov* (2018) 8(7):822–35. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0099
68. Yum S, Li M, Chen ZJ. Old Dogs, New Trick: Classic Cancer Therapies Activate Cgas. *Cell Res* (2020) 30(8):639–48. doi: 10.1038/s41422-020-0346-1
69. Achard C, Boisgerault N, Delaunay T, Roulois D, Nedellec S, Royer PJ, et al. Sensitivity of Pleural Mesothelioma to Oncolytic Measles Virus Depends on

- Defects of the Type I Interferon Response. *Oncotarget* (2015) 6(42):44892–904. doi: 10.18632/oncotarget.6285
70. Saloura V, Wang LC, Fridlender ZG, Sun J, Cheng G, Kapoor V, et al. Evaluation of an Attenuated Vesicular Stomatitis Virus Vector Expressing Interferon-Beta for Use in Malignant Pleural Mesothelioma: Heterogeneity in Interferon Responsiveness Defines Potential Efficacy. *Hum Gene Ther* (2010) 21(1):51–64. doi: 10.1089/hum.2009.088
71. Husain AN, Colby TV, Ordonez NG, Allen TC, Attanoos RL, Beasley MB, et al. Guidelines for Pathologic Diagnosis of Malignant Mesothelioma 2017 Update of the Consensus Statement From the International Mesothelioma Interest Group. *Arch Pathol Lab Med* (2018) 142(1):89–108. doi: 10.5858/arpa.2017-0124-RA

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Grard, Chatelain, Delaunay, Pons-Tostivint, Bennouna and Fonteneau. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Titre : Caractérisation des facteurs de résistance du mésothéliome pleural malin au virus oncolytique de la rougeole en modèle 3D

Mots clés : Virus de la rougeole, sphéroïdes, mésothéliome pleural malin, dormance, matrice extracellulaire, virus oncolytique

Résumé : Notre équipe étudie l'utilisation de virus oncolytiques dans le mésothéliome pleural malin (MPM). En particulier, nous étudions les mécanismes de sensibilité et de résistance des cellules tumorales au virus atténué de la rougeole (MV) et leurs effets sur la réponse immunitaire anti-tumorale. L'équipe a développé un modèle de culture en 3 dimensions (3D) de différentes lignées de MPM sous forme de sphéroïdes afin d'élucider les mécanismes de réplication et de propagation des virus dans les tumeurs. Nous avons démontré l'établissement d'une résistance au MV dans ce modèle de sphéroïdes pour une majorité de lignées de MPM (6/8). Cette résistance n'est pas surmontée par un inhibiteur de la signalisation interféron de type I (ruxolitinib), la principale défense antivirale cellulaire. Afin d'identifier la nature des facteurs de restriction au MV en 3D, nous avons réalisé une analyse transcriptomique 2D versus 3D.

Les résultats de l'analyse ont révélé l'absence de gènes différentiellement exprimés lors de l'infection par le MV dans les sphéroïdes de lignées résistantes. Cela suggère que les facteurs de restriction viraux ne sont pas activés par l'infection mais sont présents de manière basale. La méta-analyse des principales voies de signalisation communément dérégulées en 3D pour les lignées résistantes par rapport aux lignées sensibles a révélé une fibrose de la matrice extracellulaire associée à un environnement inflammatoire avec une réduction notable de la prolifération cellulaire défavorable à la réplication du MV dans les sphéroïdes de MPM. J'ai montré que la réactivation du cycle cellulaire par l'EGF est corrélée à la restauration des capacités oncolytiques du MV dans les sphéroïdes. Cette étude devrait permettre de mieux comprendre l'activité oncolytique du MV contre le MPM afin de l'améliorer.

Title : Resistance factors characterization of pleural mesothelioma to the oncolytic measles virus in 3D model

Keywords : Measles virus, spheroids, malignant pleural mesothelioma, dormancy, extracellular matrix, oncolytic virus

Abstract: Our team studies the use of oncolytic viruses in malignant pleural mesothelioma (MPM). In particular, we are studying the mechanisms of sensitivity and resistance of tumor cells to attenuated measles virus (MV) and their effects on the anti-tumor immune response. The team developed a 3-dimensional (3D) culture model of different MPM lineages in the form of spheroids in order to elucidate the mechanisms of virus replication and propagation in tumors. We demonstrated the establishment of resistance to MV in this spheroid model for a majority of MPM lines (6/8). This resistance is not overcome by an inhibitor of type I interferon signaling (ruxolitinib), the main cellular antiviral defense. In order to identify the nature of the 3D MV restriction factors, we performed a 2D versus 3D transcriptomic analysis.

The results of the analysis revealed the absence of genes differentially expressed upon MV infection in the spheroids of resistant lines. This suggests that viral restriction factors are not activated by infection but are basally present. Meta-analysis of major commonly dysregulated 3D signaling pathways for resistant versus susceptible lines revealed extracellular matrix fibrosis associated with an inflammatory environment with a notable reduction in cell proliferation unfavorable to MV replication in MPM spheroids. I have shown that the reactivation of the cell cycle by EGF is correlated with the restoration of the oncolytic capacities of MV in spheroids. This study should provide a better understanding of the oncolytic activity of MV against MPM in order to improve it.