

# Table des matières

Liste des abréviations .....	13
Table des illustrations .....	15
Introduction .....	16
I- Etude bibliographique .....	19
I.1. Les gliomes .....	19
I.1.1 Définition .....	19
I.1.2 Epidémiologie.....	19
I.1.2.1. Les cancers du SNC.....	19
I.1.2.2. Les gliomes .....	19
I.1.3 Classifications .....	20
I.1.3.1. Evolution des classifications au cours du temps .....	20
I.1.3.2. Classifications OMS 2007 .....	21
I.1.4 Le glioblastome multiforme (GBM) : une entité particulière.....	23
I.1.4.1. Généralités .....	23
I.1.4.2. Bases moléculaires du développement des GBM.....	24
a. Voies de signalisation oncogéniques.....	24
i. p16 <sup>INK4a</sup> /CDK-Cycline/Rb .....	24
ii. p14 <sup>ARF</sup> -MDM2/4-p53 .....	25
iii. PI3K-PTEN-Akt-mTOR.....	26
iv. Ras-Raf- MAPK .....	27
b. Altérations épigénétiques.....	29
I.1.4.3. Une classification moléculaire des GBM .....	29
a. GBM primaires et secondaires : des différences moléculaires .....	29
b. Vers une classification plus fine des différents types de GBM .....	30
I.1.4.4. Diagnostic .....	31
a. Présentation clinique.....	31
b. Imagerie.....	32
I.1.4.5. Traitement.....	33
a. Chirurgie .....	33
b. Radiothérapie.....	35
c. Chimiothérapie .....	36
I.1.4.6. Pronostic.....	36
I.2. Utilisation des virus oncolytiques dans la thérapie des gliomes .....	39
I.2.1 La naissance de virus oncolytiques .....	39
I.2.2 Virus oncolytique : principe .....	42

<b>I.2.2.1.</b>	<b>Deux types de virus oncolytiques</b> .....	42
<b>a.</b>	<b>Les virus naturellement oncolytiques</b> .....	42
<b>b.</b>	<b>Les virus oncolytiques génétiquement modifiés (ou virus recombinants)</b> .....	42
<b>I.2.2.2.</b>	<b>Une stimulation de la réponse immunitaire</b> .....	43
<b>I.2.3</b>	<b>Utilisation des virus oncolytiques dans le traitement des gliomes</b> .....	44
<b>I.2.3.1.</b>	<b>Herpes simplex virus</b> .....	44
<b>a.</b>	<b>Intérêt du virus</b> .....	44
<b>b.</b>	<b>Des virus oncolytiques atténués</b> .....	45
<b>c.</b>	<b>Des virus « armés »</b> .....	46
<b>d.</b>	<b>Une innocuité confirmée par les essais cliniques</b> .....	47
<b>e.</b>	<b>Une efficacité qui reste à déterminer</b> .....	48
<b>I.2.3.2.</b>	<b>Adenovirus</b> .....	51
<b>a.</b>	<b>Intérêt en tant que VO</b> .....	51
<b>b.</b>	<b>Différents types d'Adenovirus oncolytiques</b> .....	51
<i>i.</i>	<i>Deux protéines à l'origine de la sélectivité tumorale : les virus de première génération</i> .....	51
<i>ii.</i>	<i>Augmenter la sélectivité : les virus de deuxième et troisième génération</i> .....	52
<b>c.</b>	<b>Une innocuité intéressante mais remise en question</b> .....	54
<b>d.</b>	<b>Une efficacité qui reste encore à prouver</b> .....	55
<b>I.2.3.3.</b>	<b>Le virus de la maladie de Newcastle</b> .....	55
<b>a.</b>	<b>Intérêt en tant que VO</b> .....	55
<b>b.</b>	<b>Différents types de NDV oncolytiques présentant des innocuités et efficacités variées.</b> .....	56
<i>i.</i>	<i>Des souches mésogéniques</i> .....	56
<i>ii.</i>	<i>Des souches lentogéniques</i> .....	57
<b>I.2.3.4.</b>	<b>Réovirus</b> .....	58
<b>a.</b>	<b>Intérêt en tant qu'OV</b> .....	58
<b>b.</b>	<b>Une innocuité et une efficacité intéressante</b> .....	58
<i>i.</i>	<i>Etudes précliniques : un virus prometteur</i> .....	58
<i>ii.</i>	<i>Essais cliniques : une innocuité et une efficacité limitée</i> .....	59
<b>I.2.3.5.</b>	<b>D'autres virus prometteurs dans le traitement des gliomes</b> .....	60
<b>I.3.</b>	<b>Le virus myxomateux : un Poxvirus particulier</b> .....	60
<b>I.3.1</b>	<b>Classification, structure et organisation du virus</b> .....	60
<b>I.3.1.1.</b>	<b>Classification au sein des <i>Poxviridae</i></b> .....	60
<b>I.3.1.2.</b>	<b>Structure des virions</b> .....	62
<b>I.3.1.3.</b>	<b>Organisation du génome</b> .....	64
<b>I.3.2</b>	<b>Cycle viral</b> .....	65
<b>I.3.2.1.</b>	<b>Entrée dans la cellule</b> .....	65
<b>I.3.2.2.</b>	<b>Réplication et formation des virions</b> .....	66

a.	Expression des gènes précoces.....	66
b.	Réplication du génome viral.....	66
c.	Expression des gènes intermédiaires et tardifs.....	67
d.	Assemblage du virion.....	67
I.3.3	Pathogénicité.....	68
I.3.3.1.	Un virus responsable de la myxomatose.....	68
I.3.3.2.	Des facteurs de pathogénicité variés.....	69
a.	Inhibition de l'apoptose.....	70
b.	Inhibition de la réponse aux interférons.....	71
c.	Inhibition de la réponse immunitaire.....	72
d.	Activation du cycle cellulaire.....	74
e.	Facteurs d'hôte.....	75
f.	Bilan facteurs de virulence.....	75
I.4.	Intérêt du virus myxomateux dans le traitement des gliomes.....	77
I.4.1	Le MYXV est sélectif et inoffensif.....	77
I.4.1.1.	Le MYXV est très spécifique des lagomorphes.....	77
I.4.1.2.	Le MYXV est sélectif envers les cellules tumorales.....	78
I.4.1.3.	L'injection intracrânienne du MYXV est inoffensive pour les cellules cérébrales normales	79
I.4.1.4.	Le MYXV est capable d'infecter et de détruire sélectivement diverses lignées cellulaires de gliomes.....	80
I.4.2	Efficacité du MYXV sur des modèles rongeurs de gliomes.....	81
I.4.2.1.	Une efficacité optimale sur les souris immunodéprimées.....	81
I.4.2.2.	La combinaison MYXV-Rapamycine semble efficace.....	81
I.4.2.3.	L'association avec les cellules Natural Killer est prometteuse.....	82
I.4.2.4.	Améliorer la délivrance du MYXV.....	83
I.4.2.5.	Une comparaison entre les différentes stratégies est-elle possible ?.....	83
I.4.2.6.	Persistance de l'infection <i>in vivo</i> : le rôle du système immunitaire.....	84
I.4.3	Les limites du MYXV dans le traitement du gliome.....	85
I.4.3.1.	Un manque relatif d'efficacité.....	85
I.4.3.2.	Le système immunitaire à l'origine de l'élimination du virus.....	85
I.4.3.3.	La délivrance du MYXV n'est pas optimale.....	86
I.4.3.4.	Le modèle rongeur n'est pas idéal.....	87
I.4.4	L'avenir du MYXV.....	87
I.4.4.1.	Améliorer l'efficacité du MYXV.....	87
I.4.4.2.	Optimiser la délivrance et la répartition du MYXV au sein du cerveau.....	88
I.4.4.3.	Le modèle canin : un modèle d'intérêt.....	89
II-	Etude expérimentale.....	93

<b>Introduction</b> .....	93
<b>II.1. Matériels et méthodes</b> .....	95
<b>II.1.1 Virus</b> .....	95
<b>II.1.2 Lignées cellulaires</b> .....	95
<b>II.1.3 Titrage des virus sur RK13</b> .....	96
<b>II.1.4 Quantification de la charge virale par PCR quantitative</b> .....	97
<b>II.1.5 Détermination de la viabilité cellulaire après infection</b> .....	98
<b>II.1.6 Western blot : détermination du niveau endogène de p-Akt dans les différentes lignées cellulaires</b> .....	99
<b>II.1.7 Analyses statistiques</b> .....	100
<b>II.2. Résultats</b> .....	100
<b>II.2.1 La lignée J3T : une lignée permissive et sensible au MYX</b> .....	100
<b>II.2.1.1. Une permissivité majeure au MYXV souche SG33</b> .....	100
<b>II.2.1.2. Influence de la MOI dans l'étude de la permissivité des J3T</b> .....	103
<b>a. J3T est permissive au MYXV</b> .....	104
<b>b. Une cinétique modifiée par la mortalité cellulaire</b> .....	105
<b>c. Une pénétration cellulaire facilitée pour SG33</b> .....	106
<b>II.2.1.3. Le MYXV est cytotoxique pour les J3T</b> .....	108
<b>II.2.2 Cytotoxicité de SG33 et T1 envers d'autres lignées cellulaires de gliomes canins</b> .....	109
<b>II.2.2.1. Une sensibilité différente en fonction des lignées</b> .....	109
<b>II.2.2.2. SG33 est plus cytotoxique que T1</b> .....	111
<b>II.2.3 Cinétique de mortalité cellulaire au cours du temps</b> .....	112
<b>II.2.4 Une permissivité différente en fonction des lignées cellulaires</b> .....	115
<b>II.2.4.1. Une pénétration cellulaire facilitée pour SG33</b> .....	115
<b>II.2.4.2. La capacité de réplication du MYXV est différente selon la souche et la lignée cellulaire considérée</b> .....	116
<b>II.2.5 Le niveau d'Akt phosphorylé semble impliqué dans la sensibilité et la permissivité au MYXV</b> 120	
<b>II.3. Discussion</b> .....	122
<b>Conclusion générale</b> .....	134
<b>Bibliographie</b> .....	135

# Liste des abréviations

Ac : Anticorps  
ADN: Acide Desoxyribonucléique  
ADSC: cellules dérivées d'adipocytes souches  
ARN: Acide Ribonucléique  
BEV: Bevacizumab  
BLI: Bioluminescence Imaging  
BTIC: Brain Tumor Initiating Cells  
CD: Cluster of Differentiation  
CDK: Cycline Dependant Kinase  
CED : Convection Enhanced Delivery : administration locale convective  
CEV : Virus Enveloppés associées à la membrane de la Cellule  
CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité  
CPA: Cellule Présentatrice d'Antigènes  
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium  
EEV : Virions Extracellulaires Enveloppés  
EGF: Epidermal Growth Factor  
EOR: Extent of Resection  
GBM:Glioblastome  
GIM: Macrophages Associés aux Gliomes  
GM-CSF: Granulocyte Macrophage Stimulating Factor  
IDH: isocitrate dehydrogenase  
IEV: Virions Intracellulaire Enveloppé  
IFN : Interférons  
IL : Interleukine  
Injection i.c : intracrânienne  
Injection i.p: intrapéritonéale  
Injection i.t: intra-tumorale  
IMV : Virions Intracellulaires Matures  
IV: virions immatures  
KO : Knock Out  
KPS : Echelle de performance de Karnosky  
LH: Lymphome de Hodgkin  
MGMT: O-6-Methylguanine-DNA-methyltransferase  
MNF: Myxoma Nuclear Factor  
  
MOI: Multiplicity of Infection  
MV : Mature Virus  
MYXV: virus myxomateux  
NDV: Newcastle Disease Virus  
NK: Natural Killer  
OMS: Organisation Mondiale de la Santé  
PBS : Phosphate Buffered Saline  
PDGF: Platelet Derived Growth Factor  
PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase)  
PKR: Protéine Kinase  
PLFT4 : Platelet Factor 4  
qPCR : Polymerase Chain Reaction quantitative

Rb : Retinoblastoma  
RE : réticulum endoplasmique  
RI: Réponse Immunitaire  
RK13: Rabbit Kidney 13  
RR: Ribonucléotide Réductase  
SI: Système Immunitaire  
SNC: Système Nerveux Central  
SVF : Sérum de Veau Fœtal  
TCID50 : Tissue Culture Infectious Dose 50  
TIR : Terminales Inversées Répétées  
TK: Thymidine Kinase  
TMZ: Témazolomide  
TNF $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor Alpha  
UFP : Unité Formant Colonies  
VACV: virus de la vaccine  
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor  
VO: virus oncolytique

# Table des illustrations

## Figures

<b>Figure 1:</b> Tumeurs du système nerveux central.....	20
<b>Figure 2:</b> Voie de signalisation CDK-Cycline - Rb - E2F.....	25
<b>Figure 3:</b> Voie de signalisation impliquant p53.....	26
<b>Figure 4:</b> Cascade de signalisation impliquant Akt.....	27
<b>Figure 5:</b> Voies de signalisation principales impliquées dans la genèse des GBM.....	28
<b>Figure 6:</b> Classification moléculaire des GBM.....	31
<b>Figure 7:</b> IRM cérébral .....	32
<b>Figure 8:</b> Schéma explicatif du principe des virus oncolytique .....	44
<b>Figure 9:</b> Mécanisme d'action d'ICOVIR 5 .....	54
<b>Figure 10:</b> Représentation schématique d'un Orthopoxviridae .....	63
<b>Figure 11:</b> Représentation schématique des différentes formes virales de Poxviridae .....	64
<b>Figure 12:</b> Organisation générale du génome des <i>Poxviridae</i> .....	65
<b>Figure 13:</b> Pathogénèse du MYXV .....	69
<b>Figure 14:</b> Lien entre la permissivité des cellules et le niveau de phosphorylation d'Akt .....	79
<b>Figure 15:</b> Schéma explicatif du titrage sur RK13 .....	97
<b>Figure 16:</b> MTS Assay : mesure de la viabilité cellulaire après infection.....	99
<b>Figure 17:</b> Efficacité de la réplication du MYXV.....	103
<b>Figure 18:</b> Cinétiques de multiplication de SG33 et T1 à différentes MOI.....	105
<b>Figure 19:</b> Une pénétration facilitée de SG33 par rapport à T.....	108
<b>Figure 20:</b> Viabilité des J3T suite à l'infection par MYXV.....	108
<b>Figure 21 :</b> Sensibilité des différentes lignées cellulaires de gliomes canines et de RK13 aux deux souches de MYXV.....	110
<b>Figure 22:</b> Comparaison des effets cytotoxiques des virus SG33 et T1 à différentes MOI .....	112
<b>Figure 23:</b> Cinétique de la viabilité cellulaire en fonction du temps suite à l'infection par le MYXV .....	113
<b>Figure 24:</b> Pénétration du MYXV (SG33 et T1) au sein des différentes lignées de gliome canin.....	115
<b>Figure 25:</b> Cinétique de production virale en nombre de copies génome au cours du temps pour les différentes lignées de gliomes canins .....	117
<b>Figure 26:</b> Comparaison des différents niveaux de p-Akt pour les différentes lignées de gliome canin étudiées.....	121

## Tableaux

<b>Tableau 1:</b> Classification OMS 2007 simplifiée des gliomes .....	22
<b>Tableau 2:</b> Echelle de performance de Karnosky.....	34
<b>Tableau 3:</b> Facteurs pronostiques cliniques des GBM .....	37
<b>Tableau 4:</b> Facteurs pronostiques moléculaires.....	38
<b>Tableau 5:</b> Présentation de cas cliniques importants de l'histoire des virus oncolytiques .....	41
<b>Tableau 6:</b> Essais cliniques utilisant l'HVV1 .....	50
<b>Tableau 7:</b> Classification de la famille des <i>Poxviridae</i> .....	62
<b>Tableau 8:</b> Facteurs de virulence du MYXV.....	77
<b>Tableau 9:</b> Protocoles et résultats des études étudiant l'effet du MYXV sur des modèles rongeurs.....	92
<b>Tableau 10:</b> Mécanisme de lyse cellulaire et de multiplication virale évoqués par l'étude de la viabilité cellulaire au cours du temps .....	114
<b>Tableau 11:</b> Confrontation des hypothèses précédemment énoncées avec la cinétique de réplication virale au cours du temps .....	119
<b>Tableau 12:</b> Séparation des 5 lignées cellulaires en 3 groupes distincts en fonction de leur sensibilité et de leur permissivité supposée au MYXV.....	120

## Introduction

Malgré l'amélioration constante de leur diagnostic et de leurs traitements, les cancers sont une cause majeure de mortalité dans le monde. En effet, en 2008, on comptait près de 13 millions de cas avec une mortalité avoisinant les 60%. Le vieillissement de la population entraîne une augmentation de ces chiffres au cours du temps. Alors que les cancers du sein et des poumons représentent les tumeurs les plus prévalentes, d'autres tumeurs, moins connues, présentent un pronostic encore plus sombre. Parmi ces dernières, les tumeurs du système nerveux central et plus particulièrement les glioblastomes font partie des plus meurtrières. En effet, seulement 35% des patients atteints de glioblastome survivent plus d'un an, ce chiffre n'atteignant pas 10% pour les patients âgés de plus de 75 ans (Dolecek *et al.*, 2012). De plus, le pronostic n'a pas beaucoup évolué depuis plusieurs décennies malgré des progrès considérables tant au niveau du diagnostic que du traitement. Les glioblastomes sont la forme la plus maligne d'un grand groupe de tumeurs appelé « gliome ». Ces gliomes sont des tumeurs issus de la glie (astrocytes, oligodendrocytes, épendymocytes) (Louis *et al.*, 2007). De nombreuses classifications basées sur l'histologie se sont succédées afin de définir les différents types de gliomes (Bailey, 1985; Kleihues *et al.*, 2002; Louis *et al.*, 2007). Aujourd'hui, de nombreuses études ont montré que des marqueurs moléculaires particuliers permettaient une classification plus pertinente de ces tumeurs (Bastien *et al.*, 2015; Cancer Genome Atlas Research Network, 2008).

Les thérapies conventionnelles comme la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie (témozolomide notamment) sont les premières lignes de traitement des gliomes mais leur efficacité reste limitée (Alifieris and Trafalis, 2015; Amelio and Amichetti, 2012; Young *et al.*, 2015), notamment contre les glioblastomes. C'est donc pour cela que de nombreuses nouvelles stratégies sont proposées afin d'augmenter la médiane de survie des patients atteints. Une connaissance de plus en plus précise des voies de signalisation impliquées dans la tumorigenèse des gliomes a permis la mise au point de nouvelles thérapies ciblées comme le bevacizumab (Carlsson *et al.*, 2014). Cependant, les essais cliniques réalisés ne sont souvent pas à la hauteur des espérances créées par les essais précliniques. Dans ce contexte, d'autres stratégies, plus novatrices, sont également étudiées. Parmi ces stratégies, les virus oncolytiques tiennent une place importante. Leur naissance provient de l'observation de rémissions tumorales concomitantes à des infections ou des vaccinations à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle (Kelly and Russell, 2007).



Ces virus oncolytiques ont alors été définis comme des virus capables de détruire sélectivement les cellules tumorales en épargnant les tissus sains. De plus, leur multiplication autonome permet d'amplifier leurs effets au cours du temps. Adenovirus, Herpesvirus ou encore virus de la maladie de Newcastle sont étudiés dans le cadre de la thérapie anti-gliome. Ces virus peuvent être génétiquement modifiés afin d'augmenter leur spécificité ou leur efficacité anti-tumorale. *In vitro* et sur des modèles rongeurs, ces virus présentent une efficacité majeure. De plus certains essais cliniques sur l'Homme ont déjà confirmé l'intérêt grandissant pour ces nouveaux agents thérapeutiques. On note cependant un écart marqué entre la promesse des essais précliniques sur rongeurs et la réalité des essais cliniques sur l'Homme. La commercialisation de l'Adenovirus H101 pour le traitement des cancers de la tête et du cou en Chine montre malgré tout que ces virus oncolytiques représentent un espoir dans la thérapie anti-cancéreuse. Aucun virus n'est aujourd'hui utilisé à grande échelle contre les gliomes mais les essais cliniques se multiplient (Kaufmann and Chiocca, 2014).

Les résultats des différents essais cliniques s'intéressant à la virothérapie du gliome sont contrastés et ne permettent pas de déterminer avec certitude le bénéfice d'un virus par rapport à la thérapie conventionnelle (Kaufmann and Chiocca, 2014). Par conséquent, d'autres virus sont envisagés afin de trouver le candidat idéal au traitement des gliomes. Parmi ces virus, le virus myxomateux (MYXV) semble particulièrement pertinent grâce à son innocuité et son efficacité *in vitro* (Lun *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006). En effet, ce virus, très spécifique aux lagomorphes (Spiesschaert *et al.*, 2011), est capable de se multiplier au sein des cellules de gliomes et d'entraîner leur lyse. Le modèle rongeur apporte de nombreuses informations sur l'utilisation du virus *in vivo* mais ne semble pas idéal dans l'étude du MYXV dans le traitement des gliomes (Lun *et al.*, 2005; Ogbomo *et al.*, 2013; Zemp, 2013). En effet, le manque de congruence entre les modèles rongeurs et les essais sur l'Homme pour d'autres virus, associé à l'utilisation de modèles souvent immunodéprimés ou ne ressemblant pas assez à la tumeur chez l'Homme confirme le besoin d'un nouveau modèle animal capable de représenter au mieux son équivalent humain (Chen *et al.*, 2013b). Le modèle canin apparaît alors comme une alternative intéressante. En effet, l'étude d'un modèle de tumeur spontanée présentant des ressemblances marquées (histologique, moléculaire) avec l'Homme permet une translation pertinente entre les deux espèces (Chen *et al.*, 2013b; Dickinson *et al.*, 2010; Stoica *et al.*, 2004).

Ce projet de thèse s'intéresse à l'utilisation du virus myxomateux dans le traitement des gliomes à travers l'étude du modèle chien *in vitro*.

Dans une première partie nous aborderons plusieurs éléments essentiels à la compréhension du projet. Nous nous intéresserons tout d'abord aux gliomes en insistant sur leur forme la plus maligne, le glioblastome. Puis nous verrons pourquoi les virus oncolytiques représentent un agent thérapeutique de choix avant de nous concentrer sur le MYXV plus particulièrement. Nous décrirons alors ce virus puis nous montrerons en quoi son utilisation est prometteuse dans la thérapie des gliomes.

Dans un second temps, nous aborderons les résultats obtenus lors de ce projet de thèse et nous verrons en quoi le MYXV est intéressant *in vitro* dans la thérapie du gliome canin afin d'envisager, à plus long terme, son utilisation *in vivo*.

# **I- Etude bibliographique**

## **I.1. Les gliomes**

### **I.1.1 Définition**

Les gliomes sont des tumeurs du système nerveux central (SNC) qui touchent les cellules gliales comprenant notamment les astrocytes, les oligodendrocytes ainsi que les épendymocytes (Louis *et al.*, 2007). Ces cellules servent de soutien aux neurones et représentent environ 50% des cellules du cerveau humain (Azevedo *et al.*, 2009). Cependant la définition des gliomes n'est pas clairement établie comme le montrent les différentes classifications employées que nous aborderons ci-après.

### **I.1.2 Epidémiologie**

#### **I.1.2.1. Les cancers du SNC**

Les tumeurs du système nerveux central (SNC) représentent 2% des cancers chez l'adulte dans le monde. En 2012, chez l'homme, l'incidence cumulée de ces tumeurs atteint 5.9 cas /100000 personnes jusqu'à 75 ans dans les pays développés. Cette valeur est légèrement plus faible chez la femme (4.4/100000). La létalité est très élevée (68% chez l'homme, 61% chez la femme) (Torre *et al.*, 2015). En France, l'incidence atteint 7.6 cas/100000 hommes et 5.2/100000 femmes avec des taux de létalité voisins (73% chez l'homme, 56% chez la femme) (Bray *et al.*, 2013). Il est intéressant de noter que cette incidence est différente selon les régions. En effet, une étude menée en Gironde entre 2000 et 2007 révèle une incidence largement supérieure de 17.5 cas /100000 personnes (Baldi *et al.*, 2011).

#### **I.1.2.2. Les gliomes**

Les gliomes représentent 28% des tumeurs du SNC et plus de 80% des tumeurs cérébrales malignes (Fig.1A,B) (Ostrom *et al.*, 2013). Ils sont la deuxième cause de mortalité chez les enfants de moins de 14 ans atteints d'un cancer, et la troisième pour la tranche d'âge des 15-39 ans. Parmi les différents types de gliomes que nous détaillerons ensuite, les glioblastomes (GBM) sont les plus sévères. En effet, il n'y a que 35% de survie à 1 an et 2,4% à 5 ans bien que cette valeur varie en fonction des études (Ostrom *et al.*, 2013). Le GBM est une des tumeurs les plus fréquentes du SNC (Fig.1A). La mortalité est cependant très variable

en fonction du type de gliome, les formes les plus agressives étant logiquement les plus mortelles.

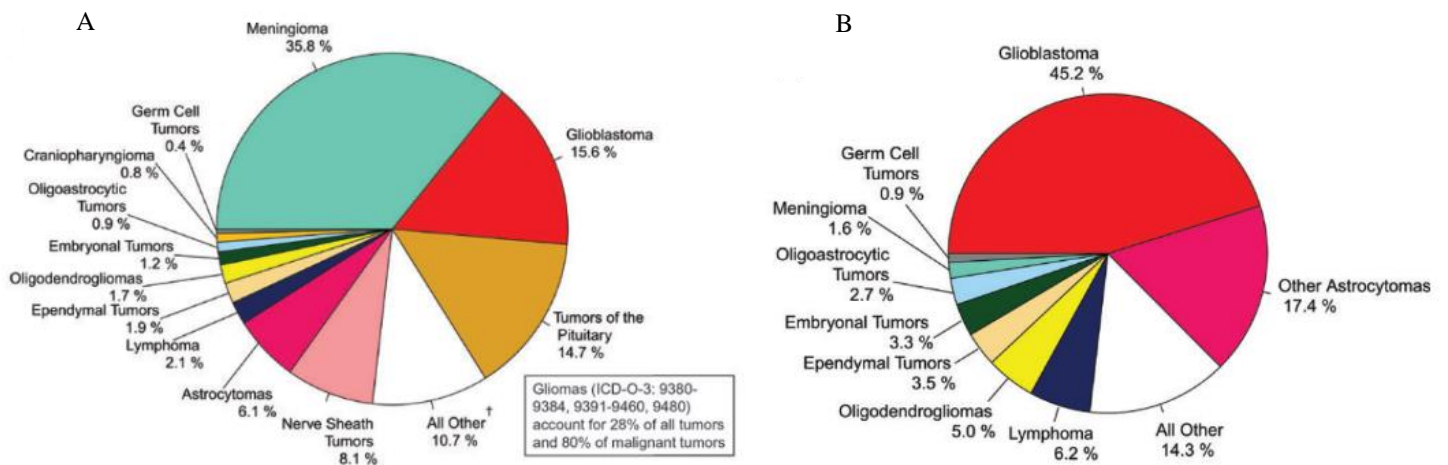


Figure 1: Tumeurs du système nerveux central, A) représente l'ensemble des tumeurs du SNC et B) uniquement les tumeurs malignes (issu de Ostrom et al. 2014)

### I.1.3 Classifications

#### I.1.3.1. Evolution des classifications au cours du temps

Les différentes classifications de gliomes s'appuient principalement sur deux hypothèses permettant d'expliquer la genèse des gliomes :

- La transformation de cellules différenciées : les cellules matures transformées auraient la capacité de se diviser et de donner naissance à une tumeur. Néanmoins, cette théorie n'explique pas l'existence de tumeurs mixtes (tumeurs possédant différents types cellulaires : astrocytes et oligodendrocytes par exemple).
- La transformation de cellules souches ou progénitrices: ces cellules pluri ou multipotentes transformées pourraient être à l'origine de tumeurs formées de différents types cytologiques.

La première classification histologique des tumeurs cérébrales fut établie par Bailey et Cushing en 1926 (Bailey, 1985). Elle était fondée sur le principe de l'histogenèse et la théorie des restes embryonnaires. Selon ce principe, les cellules embryonnaires s'arrêtaient à différents stades à partir desquels débutaient le développement tumoral. Bailey et Cushing ont donc classé les gliomes en fonction de leur similarité avec les différents stades de différenciation au cours

de l'embryogenèse et ont ainsi décrit quatre types de gliomes astrocytaires (glioblastome, spongioblastome polaire, astroblastome et astrocytome fibrillaire), et un type d'oligodendrogliome.

En 1949, Kernohan *et al.* ont supposé que les gliomes se développaient à partir de cellules adultes susceptibles de se différencier. C'est aussi à ce moment que la notion de grade histologique de malignité fut fondée : elle reposait alors sur la présence ou l'absence de critères d'anaplasie comme l'index de mitoses ou les atypies cytonucléaires (Kernohan and Mabon, 1949).

En 1979, la première classification OMS (Organisation Mondiale de la Santé) a établi un premier consensus en associant des éléments de la classification de Bailey et Cushing à celle de Kernohan. La classification OMS a ensuite subi plusieurs révisions (1993, 2000, 2007), mais n'a sensiblement pas évolué : le type tumoral est défini en fonction du type cytologique prédominant et le grade en fonction des critères d'anaplasie.

Les principales modifications de la classification OMS ont concerné le cadre nosologique des glioblastomes. Classé en 1976 comme des tumeurs mal différenciées et embryonnaires, les glioblastomes ont intégré en 1993 le groupe des tumeurs astrocytaires et en 2007, la notion de glioblastome à composante oligodendrogliale a été ajoutée à la classification.

Des données récentes de la biologie et de la génétique moléculaire sont venues compléter cette classification histologique dans la version de 2000 (Kleihues *et al.*, 2002) puis de 2007 de l'OMS (Louis *et al.*, 2007). Une nouvelle version est attendue dans les mois qui arrivent mais nous allons détailler la dernière classification actuelle.

### **I.1.3.2. Classifications OMS 2007**

La classification actuelle sépare les gliomes en plusieurs grands types issus de la différenciation des cellules tumorales, eux-mêmes subdivisés en fonction du grade de la tumeur considérée (Tableau 1). Les types les plus fréquents sont :

- Les astrocytomes dont les cellules ont pour la plupart des caractéristiques histologiques et immunohistochimiques d'astrocytes.
- Les oligodendrogliomes possédant des oligodendrocytes.
- Les tumeurs mixtes ou oligo-astrocytomes, ayant des caractéristiques des deux types cellulaires.
- Les épendymomes ayant plutôt les caractéristiques des épendymocytes.

Types	Sous-types	Variantes	Grade
Astrocytome	Astrocytome pilocytique	Astrocytome pilocytique	I
		Astrocytome pilomyxoïde	I
	Astrocytome sous épendymaire à cellules géantes		I
	Xanthoastrocytome pléomorphe		II
	Astrocytome diffus	Fibrillaire	II
		Protoplasmique	II
		Gémistocytique	II
	Astrocytome anaplasique		III
	Glioblastome	A grandes cellules	IV
		Gliosarcome	IV
	Gliomatosis cerebri		IV
Oligodendrogliomes	Oligodendrogliome		II
	Oligodendrogliome anaplasique		III
Oligoastrocytomes	Oligoastrocytome		II
	Oligoastrocytome anaplasique		III
Ependymomes	Subependymome		I
	Ependymome myxopapillaire		I
	Ependymomes	Cellulaire	II
		Papillaire	II
		A cellule claire	II
		Tanycytique	II
Ependymome anaplasique		III	

*Tableau 1: Classification OMS 2007 simplifiée des gliomes (d'après Louis et al., 2007)*

## **I.1.4 Le glioblastome multiforme (GBM) : une entité particulière**

Les gliomes sont donc un ensemble de tumeurs dont la forme la plus sévère est le glioblastome ou Glioblastoma Multiforme (GBM) sur laquelle nous nous concentrerons dans cette partie.

### **I.1.4.1. Généralités**

Le GBM a été décrit pour la première fois en 1869 par le Dr Rudolf Virchow comme une tumeur d'origine gliale, identifiée à l'aide d'observations macroscopiques et microscopiques. En 1920, le Dr Walter Dandy réalisa l'exérèse d'un hémisphère entier de 2 patients souffrant de GBM. Malgré les résultats décevants de cette technique, cet événement fut un premier pas permettant de caractériser l'invasivité du GBM au sein du cerveau. Le GBM, alors connu sous le nom de spongioblastoma multiforme, fut nommé GBM en 1926 grâce à Bailey et Cushing qui furent les précurseurs de la recherche sur les caractères histologiques des gliomes (Agnihotri *et al.*, 2013).

Avec une incidence de 3.19 cas /100000 personnes, le GBM est le gliome le plus fréquent. De plus, c'est celui qui présente le plus mauvais pronostic. En effet la survie à 5 ans ne dépasse pas 5% et la médiane de survie (MST) atteint seulement 12 à 15 mois malgré les différents traitements réalisés (Vigneswaran *et al.*, 2015).

Les hémisphères cérébraux sont les plus régulièrement touchés par les GBM puisque 95% se développent en région supratentoriale.

On distingue 2 types de GBM :

- Les GBM primaires sont la forme la plus commune. Ils se développent de novo en 3-6 mois chez des patients âgés.
- Les GBM secondaires qui sont issus des astrocytomes de bas grade. On les retrouve plutôt chez les jeunes patients.

Même si quelques différences moléculaires sont présentes entre les 2 formes de GBM, les conséquences sont similaires puisque GBM primaires et secondaires présentent les mêmes dérégulations des voies de signalisation, et répondent tout deux très mal aux traitements conventionnels.

#### **I.1.4.2. Bases moléculaires du développement des GBM**

Des progrès considérables ont été réalisés au cours des 20 dernières années afin de comprendre la genèse des gliomes. Le projet de l'Atlas du Génome des Cancer (TCGA) a permis l'étude de 520 prélèvements de gliomes, à travers les microARN, les ARN messagers, le polymorphisme nucléotidique ou le séquençage d'exome. De plus, de nombreux gènes ont été identifiés comme candidats potentiels à la genèse des GBM (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). Nous allons alors détailler ces altérations en se focalisant sur certains événements primordiaux du développement des GBM.

##### **a. Voies de signalisation oncogéniques**

###### **i. p16<sup>INK4a</sup>/CDK-Cycline/Rb**

Dans un contexte normal, la progression d'une cellule dans le cycle cellulaire est contrôlée étroitement par de nombreux « check-point ». Ils permettent de vérifier l'intégrité de la cellule et d'arrêter le processus si celle-ci n'est pas saine. La plupart des cellules tumorales, dont les GBM, ont perdu cette capacité.

La cascade de signalisation impliquant p16<sup>INK4</sup>/Cycline-Dependant-Kinase (CDK)4/Retinoblastoma (Rb) possède un rôle majeur dans la transition G1-S (phase correspondant au début de la mitose). En effet, le complexe CDK/Cyclin D1 phosphoryle la protéine Rb1 entraînant son détachement du facteur de transcription E2F et donc son activation (Rb réprime donc l'activité de E2F). E2F est alors à l'origine de la transition G1/S (Ueki *et al.*, 1996). Cependant, la protéine p16<sup>INK4</sup> est capable d'empêcher la formation du complexe CDK/Cycline évitant l'entrée en phase de mitose (Fig.2).

La mutation perte de fonction du gène codant pour Rb a été retrouvée dans 20% des GBM et semble impliquée dans la genèse des gliomes (Mao *et al.*, 2012) : or Rb permettant d'inhiber E2F, son inactivation entraîne alors la progression du cycle cellulaire. De la même façon, des mutations de p16 et/ou une amplification des CDK sont présentes dans plus de 50% des GBM et permettent alors le développement tumoral (Lam *et al.*, 2000).



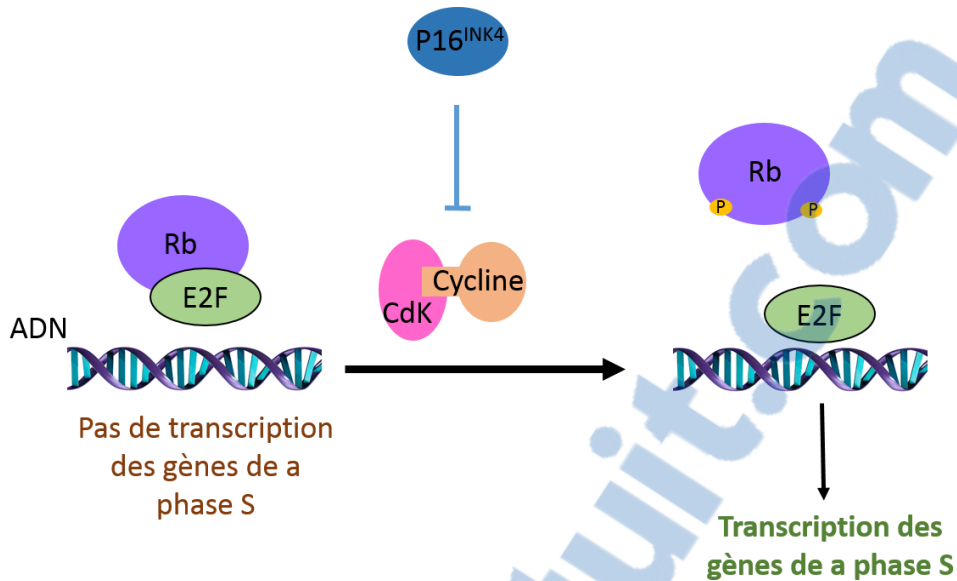


Figure 2: Voie de signalisation CDK-Cycline - Rb - E2F

## ii. p14<sup>ARF</sup>-MDM2/4-p53

Le gène codant pour la protéine p53 est un gène suppresseur de tumeur et un facteur de transcription bien connu impliqué dans de nombreux cancers qui régule des processus comme l'apoptose, la réparation de l'ADN, la néovascularisation et le métabolisme. D'après le TCGA, une mutation inactivatrice de p53 a été retrouvée dans 37.5 et 58% des GBM non traités et traités respectivement. Ce gène étant impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire on comprend aisément que sa mutation puisse permettre la genèse des GBM (Bastien *et al.*, 2015).

Des mutations du gène codant pour MDM2/4 ou ARF sont présentes dans 70% des GBM. Or MDM2/4 peut dégrader la protéine p53. Par conséquent, une amplification de cette protéine peut inhiber p53 et permettre la tumorigenèse (Bastien *et al.*, 2015).

De la même façon, une mutation perte de fonction de p14<sup>ARF</sup> peut inhiber p53 (Fig.3). En effet cette protéine, lorsqu'elle est active permet d'inhiber MDM2/4 (Bastien *et al.*, 2015). Il est intéressant de noter que p14<sup>ARF</sup> et p16<sup>INK4</sup> sont codées par le même gène CDKN2a qui est délété dans 55% des GBM (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008).

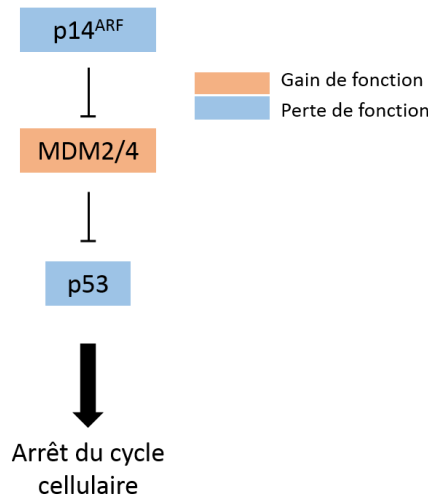


Figure 3: Voie de signalisation impliquant p53

### iii. PI3K-PTEN-Akt-mTOR

Cette voie de signalisation régule des fonctions telles que la tumorigénèse, la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'invasion et la mobilité des cellules.

L'activité de la PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) est régulée par de nombreux facteurs de croissance et leur récepteur à tyrosine kinase (RTK) respectifs comme l'EGF-EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) ou le PDGF-PDGFR (Platelet Derived Growth Factor Receptor). La PI3K est à l'origine de l'activation d'Akt, qui va ensuite activer la protéine mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) à l'origine de la division et de la prolifération cellulaire. A l'inverse PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) inhibe cette cascade de signalisation (Fig. 4).

L'activation constitutive de la cascade de signalisation de PI3K joue un rôle fondamental dans le développement des GBM. En effet près de 70% des GBM présentent cette altération (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). Cette suractivation est possible grâce à plusieurs mécanismes :

- Un mécanisme dépend du couple EGF-EGFR. L'EGF est un facteur de croissance impliqué dans la survie, la différenciation, la migration et la prolifération des cellules. Il se fixe à son récepteur EGFR afin d'activer, entre autre, la PI3K. L'amplification génique de l'EGFR est très fréquente au sein des GBM (35% des GBM (Rao *et al.*, 2010), l'EGF se fixe alors à son récepteur, présent en plus grande quantité. Mais l'EGFR peut aussi être activé indépendamment à son ligand : ainsi la mutation EGFR variant III est la plus commune et permet une activation constitutive de l'EGFR (20-30% des GBM présentant une amplification de l'EGFR) (Akhavan *et al.*, 2010). L'hyperactivation de l'EGFR est ensuite à l'origine d'un grand nombre de mécanismes impliqués dans la

genèse ou la progression tumorale comme l'expression de l'IL-13RA2 ou de diverses métalloprotéinases (Lal *et al.*, 2002).

- Une amplification de mTOR est aussi possible. La protéine mTOR est composée de 2 parties qui s'organisent en 2 complexes distincts: mTORC1 et mTORC2. Tous deux sont impliqués dans la cascade d'activation d'Akt (Akhavan *et al.*, 2010).
- La perte de fonction de la protéine PTEN supposée inhiber l'activation d'Akt est retrouvée dans près de 50% des GBM (Choe *et al.*, 2003).

D'autres modifications génétiques concernant PI3K (Akhavan *et al.*, 2010) ou encore PDGFR (Westermarck, 2014) sont aussi possiblement impliqués dans la pathogénie des GBM.

Ces mutations donnent aussi des indications quant à la genèse des GBM. En effet, les mutations de p53 et les amplifications de l'EGFR son exclusives : cela évoque deux voies différentes de la genèse des GBM (Ohgaki and Kleihues, 2013).

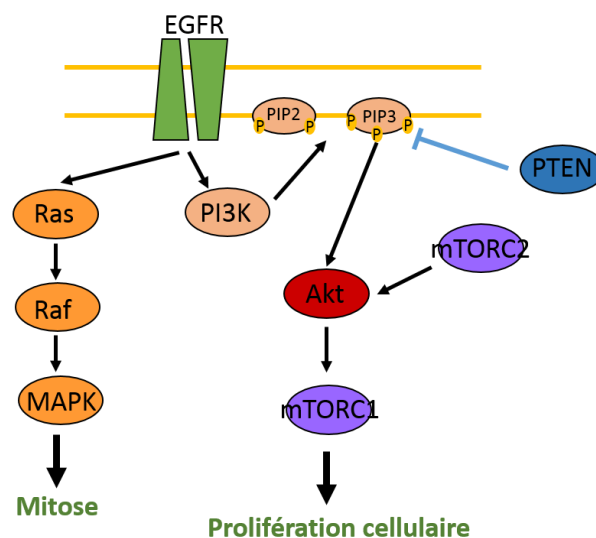


Figure 4: Cascade de signalisation impliquant Akt

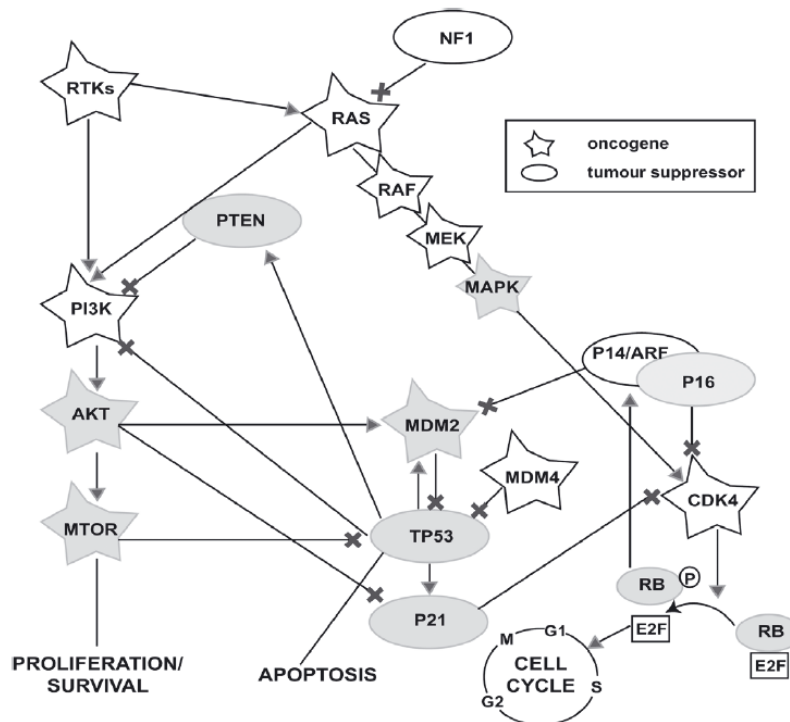
#### iv. Ras-Raf- MAPK

Le gène Ras (Rat Sarcoma) est un oncogène bien connu appartenant à la famille de protéine G. La protéine Ras est alors capable d'activer Raf, lui-même à l'origine de la régulation de la MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) à l'origine de l'entrée en mitose. Ras participe aussi à la régulation de la PI3K et est donc une protéine majeure de la prolifération, de l'apoptose et de la tumorigenèse. Une mutation-gain de fonction de Ras entraîne une persistance de la forme active de Ras qui reste couplée à un GTP (Guanine TriPhosphate) (Fig.4).

A l'image de la voie de signalisation de PI3K, l'activité de Ras est régulée par les facteurs de croissance précédemment cités (EGF, PDGF). Il semble d'ailleurs que ces facteurs jouent un rôle prépondérant dans l'activation de la voie de signalisation de Ras. En effet, la mutation de Ras est peu courante au sein des GBM alors que la quantité de Ras-GTP est augmentée (Crespo *et al.*, 2015). Une étude bio-informatique a permis de constater que le gène nRAS (neuroblastoma RAS) était un des gènes les plus différemment exprimés entre des GBM et des cerveaux sains (Li *et al.*, 2014) renforçant l'importance de la voie Ras-MAPK.

Ras peut aussi être activée à cause d'une mutation-perte de fonction du gène NF1 (Neurofibromatosis type I) dont la protéine régule négativement l'activité de Ras. Il semble que cette mutation soit présente dans 20% des GBM (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008).

De nombreuses mutations ou amplification sont donc potentiellement impliquées dans la genèse des GBM. Or, toutes les protéines précédemment citées font partie d'un réseau de signalisation et chacune d'entre elles peut, plus ou moins directement, influencer sur l'autre (Fig.5).



**Figure 5:** Voies de signalisation principales impliquées dans la genèse des GBM (issu de Boudreau *et al.*, 2015). L'ensemble des voies de signalisation décrites sont en relation étroite les unes avec les autres : toutes participent, plus ou moins directement, à la poursuite du cycle cellulaire, à la prolifération/survie ou à l'inhibition de l'apoptose.

## **b. Altérations épigénétiques**

Les gliomes, et notamment les GBM, présentent de nombreuses altérations épigénétiques qui modifient le niveau d'expression des gènes. Parmi ces mécanismes épigénétiques, plusieurs sont impliqués dans la genèse des GBM comme la méthylation de l'ADN, les modifications des histones, le remodelage de la chromatine ou encore l'expression des ARN non codant. La modification la plus étudiée reste la méthylation de l'ADN c'est-à-dire la présence d'un groupement méthyl sur la cytosine située au niveau d'un îlot CpG de l'ADN. Le rôle de la méthylation de l'ADN serait responsable de la perte de fonction des gènes Rb ou p16 précédemment mentionnés (Costello, 2003).

De plus, la méthylation du promoteur de l'enzyme de réparation de l'ADN MGMT (O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA-Methyltransferase) est rencontrée dans près de 50% des cas de gliomes. Cette méthylation entraîne alors une diminution de la capacité de la cellule tumorale à réparer l'ADN (Chan *et al.*, 2011) et a une importance capitale dans la réponse au traitement.

### **I.1.4.3. Une classification moléculaire des GBM**

#### **a. GBM primaires et secondaires : des différences moléculaires**

Comme évoqué précédemment les GBM se divisent en deux formes : les GBM primaires et secondaires. L'étude des nombreux événements génétiques et épigénétiques à l'origine du développement des gliomes a permis de mettre en évidence des différences marquées entre ces 2 formes de GBM.

Les GBM primaires présentent 3 types principaux d'altérations génétiques : (i) amplification ou mutation de l'EGFR, (ii) délétion homozygote du gène CDKN2A-p16<sup>INK4a</sup> et/ou CDKN2A-p14<sup>ARF</sup> (iii) délétion du gène PTEN. De plus, l'amplification de MDM2 est présent, mais à un degrés moindre (<15% des GBM) notamment pour les GBM qui ne présentent pas de mutation de p53 (Crespo *et al.*, 2015).

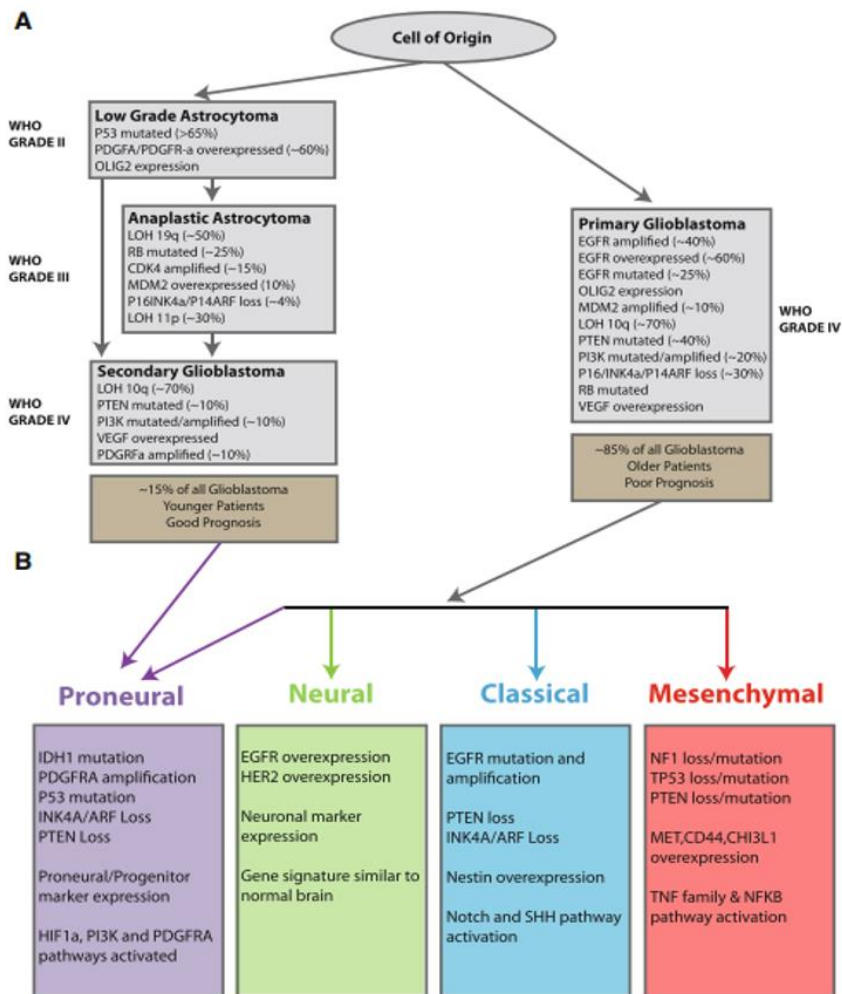
A l'inverse des GBM primaires, les GBM secondaires présentent des mutations du gène codant pour p53. De plus, des mutations des gènes codant pour l'isocitrate déshydrogénase 1 (IDH1) et l'IDH2 sont fréquemment rencontrées au sein des gliomes de bas grade et des GBM secondaires, traduisant du caractère progressif du développement de ces GBM. Il semble que les mutations des IDH1 et 2 soient reliées à une hyperméthylation de l'ADN : les IDH

participent donc à l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs par méthylation. Ceci a été démontré pour le gène HRK (proapoptotic Harakiri) dont le promoteur, lorsqu'il est hyperméthylé, empêche la transcription de la protéine à l'origine de son inactivation (Inohara *et al.*, 1997).

#### **b. Vers une classification plus fine des différents types de GBM**

Plus que confirmer l'existence de 2 sous-types de GBM, les études des niveaux d'expression des gènes ont permis de mettre en évidence de nombreuses classifications des GBM fondées sur des niveaux d'expression variés des gènes d'intérêt.

La classification qui semble aujourd'hui la plus pertinente est celle proposée par Verrhaak *et al.* en 2010 (Fig.6). Celle-ci reprend les gènes mentionnés précédemment et fait intervenir d'autres gènes comme celui du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ou de l'HIF1 $\alpha$  (Hypoxia inducible factor) impliqué dans la néoangiogenèse tumorale par exemple. Verrhaak a alors défini 4 sous-types de GBM : proneural, neural, classique et mésenchymateux en fonction des différentes altérations génétiques qu'ils présentent.



## Molecular Subtypes of Glioblastoma

**Figure 6:** Classification moléculaire des GBM (d'après Verrhaak et al., 2010 issue de Ajeawung 2014). A) représente les différentes altérations génétiques et leur pourcentage respectif au sein des différents types histologiques de GBM et B) représente la classification moléculaire des GBM fondée sur le partage de ces altérations génétiques.

### I.1.4.4. Diagnostic

#### a. Présentation clinique

Les symptômes associés aux gliomes et surtout aux glioblastomes sont très dépendants de leur localisation, de leur taille et de leur vitesse de croissance. Des symptômes neurologiques spécifiques à la zone du cerveau touchée peuvent apparaître et des symptômes généraux peuvent être présents si la tumeur est responsable d'une augmentation de la pression intracrânienne (Young *et al.*, 2015).

Le symptôme le plus rencontré est la crise convulsive (Rudà *et al.*, 2012) dont la fréquence et l'intensité sont liées au type de tumeur et à sa localisation. D'autres symptômes

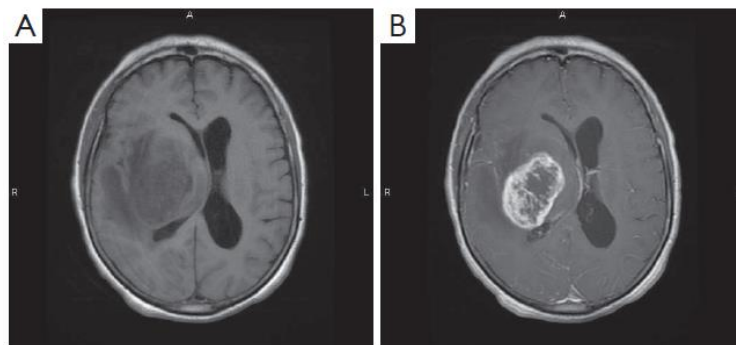
comme des céphalées persistantes, de la nausée, des vomissements ou encore des troubles de la vision et de la cognition (perte de mémoire, diminution de la concentration...) peuvent être associés à la présence d'un gliome. De façon plus anecdotique, l'aphasie, l'hémiplégie ou encore l'incontinence urinaire sont parfois en lien avec la tumeur (Omuro A and DeAngelis LM, 2013).

Cependant, la présence de ces symptômes est non spécifique et peut être associée à de nombreuses affections intracrâniennes ou non. C'est alors que l'imagerie associée à l'histologie permet un diagnostic de certitude dans la plupart des cas.

### b. Imagerie

Devant des symptômes neurologiques non spécifiques, un examen tomodensitométrique sans contraste du crâne est souvent utilisé en première intention. Pour un GBM, l'examen avec prise de contraste permet de mettre en évidence un anneau hétérogène hyperdense avec un centre hypodense. Souvent, on trouve, en périphérie, une zone hypodense correspondant à l'œdème vasogénique secondaire à la tumeur (Young *et al.*, 2015).

Bien que le scanner soit intéressant au moment de la présentation, l'IRM avec produit de contraste (gadolinium) reste l'examen de choix dans le diagnostic du GBM. Le GBM apparaît comme une masse fixant le produit de contraste. En effet cette propriété (que l'on retrouve pour le scanner) serait liée à une perméabilité accrue de la vasculature de la tumeur (Ellingson, 2014). Cette prise de contraste est associée à un centre hypointense qui correspond aux zones de nécrose. Les marges de la tumeur sont souvent irrégulières et peu définies. Parfois l'IRM peut mettre en évidence l'œdème qui entoure la tumeur ou les microhémorragies que peut contenir le GBM (Fig.7A,B).



**Figure 7:** IRM cérébral (A) Image axiale sans produit de contraste ; (B) Image axiale avec produit de contraste qui montre une prise de contraste importante, hétérogène avec un centre hypointense compatible avec une tumeur associée à son centre nécrotique (issu de Young *et al.*, 2015) .



D'autres types de séquences IRM peuvent s'avérer utiles comme la DWI/ADC. En effet, certaines études ont conclu que ce type d'IRM permettait d'évaluer la cellularité de la tumeur permettant alors de présupposer du grade du gliome (les plus fortes cellularités étant plus associées aux GBM) (Young *et al.*, 2015).

D'autres examens d'imagerie comme la spectroscopie, ou la tomographie par émission de positrons (PET) avec plusieurs radiotraceurs peuvent s'avérer très informatifs. Par exemple, la spectroscopie est une méthode non invasive qui permet de mesurer la quantité de certains métabolites par rapport à leur fréquence de résonance. On peut alors citer la choline (Cho), le N-Acétylaspartate (NAA), les lactates, les lipides ou la créatinine qui sont communément utilisés dans le diagnostic des GBM. Par exemple, des niveaux élevés de Cho et de NAA sont souvent associés à l'agressivité de la tumeur (Young *et al.*, 2015).

Aujourd'hui, des techniques d'IRM très récentes permettent le typage moléculaire de certains GBM à l'aide de l'imagerie, ce qui représente une avancée particulièrement intéressante dans le diagnostic des GBM (ElBanan *et al.*, 2015).

#### **I.1.4.5. Traitement**

##### **a. Chirurgie**

La chirurgie est souvent la première ligne de traitement face à un GBM. L'imagerie est bien sûr indispensable à la bonne réalisation de la chirurgie. Cependant, avant d'envisager l'exérèse de la tumeur, le patient doit répondre à certains critères. Tout d'abord la localisation de la tumeur a une importance capitale. Si elle est située au sein du cortex éloquent (zones du cortex impliquée dans la fonction motrice ou du langage), la résection sera peu utilisée à cause de l'importance des structures adjacentes à la tumeur (Young *et al.*, 2015). L'échelle de performance de Karnosky (KPS) (Tableau 2) qui permet de mesurer l'autonomie d'un patient, est aussi un indicateur intéressant permettant d'identifier les « bons » candidats à la chirurgie. En effet, sachant que la chirurgie peut-être délétère dans certains cas, le statut neurologique du patient doit être le plus haut possible en préopératoire. Il semble que si l'index de KPS est supérieur à 90 en préopératoire, la récupération fonctionnelle est meilleure en post-opératoire (Chaichana *et al.*, 2011). La plupart du temps, la chirurgie n'est proposée que si cet index est supérieur à 70. Bien entendu, cette valeur n'est pas absolue et peut-être revue au cas par cas (Chambless *et al.*, 2015).

Tableau 2: Echelle de performance de Karnosky (issu de Chambless et al. 2015)

100	Normal with no signs or symptoms of disease
90	Conducts normal activity with few signs of symptoms
80	Conducts normal activity with some difficulty
70	Cannot conduct normal activity but still cares for self
60	Requires occasional help to care for self
50	Requires frequent help to care for self
40	Disabled
30	Severely disabled; hospital admission may be indicated
20	Hospital admission and treatment required
10	Moribund
0	Dead

Lors de la chirurgie, le patient peut être éveillé : cela permet de tester la fonctionnalité de certains centres nerveux si la tumeur est proche du cortex éloquent. Ce type de chirurgie reste cependant rare compte tenu des critères préopératoires discutés précédemment.

La plupart du temps, une anesthésie générale est réalisée. Dans tous les cas, le paramètre le plus important à considérer est l'étendue de la résection (EOR : Extent of Resection). Il semble logique que si l'EOR augmente, la MST et le temps de la rémission soient meilleurs (Sanai *et al.*, 2011). De plus, de nombreuses études ont essayé de déterminer une valeur seuil à partir de laquelle l'EOR pouvait être bénéfique pour la survie du patient. En 2001, Lacroix *et al.* considéraient que seul un EOR >98% permettait d'augmenter la survie des patients atteints de GBM. Dix ans plus tard, Sanai *et al.* ont étudié la relation entre l'EOR et la survie de patient atteint des GBM nouvellement diagnostiqués. Dans ce cadre, un EOR de 78% était suffisant pour permettre une amélioration de la survie (Sanai *et al.*, 2011). Cependant, l'augmentation de l'EOR est aussi à l'origine de l'augmentation de la fréquence des effets secondaires neurologiques (Oppenlander *et al.*, 2014). Considérer la balance bénéfice-risque dans le cadre de la résection des GBM est donc cruciale pour les neurologistes. Plus récemment, plusieurs études ont souligné l'importance du volume tumoral résiduel (volume tumoral présent après résection) dans le pronostic. En effet, il semble que ce critère soit autant, si ce n'est plus important, que l'EOR. L'amélioration de la prise en charge post-opératoire (utilisation du témozolomide) permet alors un EOR plus faible à condition que le volume tumoral résiduel soit faible (Grabowski *et al.*, 2014; Young *et al.*, 2015). En outre, les progrès importants en imagerie pré et peropératoire permettent d'augmenter la précision de l'acte chirurgical (Young *et al.*, 2015).

## b. Radiothérapie

La radiothérapie est une technique qui entraîne, entre autre, des cassures double brin de l'ADN à l'origine de l'entrée en apoptose des cellules tumorales (Dhermain, 2014). Elle est en première ligne pour le traitement des GBM, notamment pour les patients n'ayant pas pu bénéficier d'un EOR maximal.

L'imagerie est prépondérante dans la planification de la radiothérapie. En effet, IRM et tomodensitométrie permettent de définir le volume de tumeur à traiter qui dépend du volume de la tumeur, des marges à traiter autour de cette tumeur et des tissus sains environnants. L'objectif étant alors de détruire la tumeur sans léser les tissus sains (Carlsson *et al.*, 2014).

La radiothérapie externe est la radiothérapie conventionnelle, la dose standard est de 60 Gray (Gy) répartie en 30 séances (6 séances par semaines sur 5 semaines). Aucune étude n'a pour le moment clairement démontré qu'une dose supérieure permettait une survie plus longue (Carlsson *et al.*, 2014). Cependant certaines études tendent à montrer que des doses supérieurs pourraient être intéressantes bien que la méthodologie soit critiquable (Tanaka *et al.*, 2005). De multiples variations du protocole sont étudiées : la radiothérapie hyperfractionnée (doses inférieures avec plus de séances mais rapprochées dans le temps), la radiothérapie hypofractionnée (doses plus importantes en moins de séances et en moins de temps), mais ne montrent pas d'avantage particulier par rapport à la radiothérapie conventionnelle (Villà *et al.*, 2014).

La brachythérapie consiste en l'implantation chirurgicale d'une source radioactive au sein de la tumeur après sa résection maximale. Cette technique permet de focaliser le traitement en épargnant les tissus sains environnants. Cette modalité de traitement apparaît efficace à condition que l'EOR soit élevé (Amelio and Amichetti, 2012).

Contrairement à la brachythérapie, l'utilisation de la radiochirurgie (Gamma Knife) permet d'éviter toute procédure chirurgicale (contrairement à ce que son nom indique). Une source de rayons (gamma, photons) est focalisée à hautes doses au niveau de la tumeur en épargnant les tissus adjacents (Carlsson *et al.*, 2014). Cependant, cette technique semble plus adaptée aux récurrences qu'à la tumeur nouvellement diagnostiquée à cause de leur volume souvent supérieur (Amelio and Amichetti, 2012).

L'utilisation d'agents de chimiothérapie en combinaison avec la chirurgie et la radiothérapie apparaît comme une solution efficace. En effet, la résection tumorale suivie de la radiothérapie externe associée au témozolomide est le protocole standard dans le traitement des GBM (Villà *et al.*, 2014).

### **c. Chimiothérapie**

Le témozolomide (TMZ) est un agent alkylant dont la distribution dans le système nerveux central est très bonne. Son efficacité est supérieure à celle de la radiothérapie seule comme l'ont montré Stupp *et al.* en 2005 sur 573 patients (RT+TMZ : MST = 14.6 mois, RT seule : MST= 12.1 mois) (Stupp *et al.*, 2005). De plus, il semble que le TMZ soit plus efficace sur les GBM présentant une méthylation du promoteur MGMT (Stupp *et al.*, 2009). Enfin, une méta-analyse a montré que le bénéfice du TMZ serait accrue lors d'une utilisation métronomique (petite dose, tous les jours) (Chen *et al.*, 2013a).

D'autres agents de chimiothérapie peuvent être utilisés seuls ou en association avec les thérapies citées précédemment.

Les nitrosourés comme la lomustine et la carmustine sont d'autres agents alkylants qui peuvent aussi être utilisés. Cependant, le fort taux d'effets secondaires consécutifs (myélosuppression, vomissement, fibrose pulmonaire) à ces thérapies limite leur utilisation. Ils sont donc plutôt réservés au traitement de rechutes de GBM (Alifieris and Trafalis, 2015).

D'autres agents de chimiothérapie comme l'irinotecan, l'étoposide ou le cisplatine ou des combinaisons d'agents (procarbazine, lomustine, vincristine) sont parfois utilisés mais restent plus anecdotiques.

Le Bevacizumab (BEV) est un anticorps recombinant humain anti-VEGF qui a un rôle anti-angiogénique. Il est commercialisé uniquement aux Etats Unis, au Japon et en Suisse. Même si son mécanisme est encore mal connu, il semble que le BEV soit capable de normaliser les vaisseaux autour de la tumeur, et d'augmenter ainsi la délivrance d'autres agents de chimiothérapie. Le BEV semble cependant peu efficace sur les gliomes nouvellement diagnostiqués. En effet, le BEV permet de retarder la survenue de rechute et de maintenir une qualité de vie plus élevée, mais n'augmente pas la MST comme le montre l'essai clinique de phase III de Chinot *et al.* (Chinot *et al.*, 2014). Cependant, il apparaît plus efficace sur les tumeurs récidivantes répondant mal aux traitements de premières intentions (Castro and Aghi, 2014). Son utilisation est donc dépendante de la tumeur considérée (Field *et al.*, 2015).

#### **I.1.4.6. Pronostic**

Le pronostic des GBM est très mauvais. Sans traitement, la MST ne s'élève pas au-delà de 1.9 mois, soulignant le caractère très agressif de cette tumeur.

Avec traitement, comme déjà évoqué, la MST des patients atteints de GBM a peu évolué pendant les 30 dernières années. Cependant, l'arrivée du TMZ a quelque peu amélioré la survie des patients. En effet, la MST entre 1970 et 1990 était de 7 à 10 mois avec un pourcentage de survie à 5 ans de 5%. Pendant cette période, les techniques d'imagerie et de chirurgie ont cependant fortement évolué permettant une visualisation plus précise de la tumeur et un EOR supérieur. Ces progrès sont peut-être à l'origine d'une diminution du temps passé hospitalisé (90.7 jours dans les années 1980 contre 53.7 jours dans les années 1990) (Woehrer *et al.*, 2014).

L'arrivée du TMZ a permis selon les études de rajouter 1 à 2 mois à la MST des patients atteints de GBM (Woehrer *et al.*, 2014). En effet, l'étude Stupp *et al.* a montré une MST de 14.6 mois avec le TMZ contre 12.1 mois sans (Stupp *et al.*, 2009). De plus, d'après Johnson *et al.* la commercialisation du BEV aurait permis d'augmenter encore la MST des patients aux Etats-Unis (Johnson *et al.*, 2013). De nombreux facteurs pronostiques sont étudiés afin de préciser, avant traitement, les chances de survie des patients. On différencie les facteurs cliniques des facteurs moléculaires :

- Concernant les facteurs cliniques il semble que l'âge (MST divisée par 5 pour les patients de plus de 75 ans), l'origine géographique, le statut marital, l'étendue de la résection tumorale (la résection complète permet une survie supérieure) ou encore la localisation de la tumeur sont autant de facteurs qui apparaissent significatifs sur une étude récente menée aux Etats-Unis (Pan *et al.*, 2015) (Tableau 3). Cette étude rejoint, en partie, les résultats de Stupp *et al.* mentionnés précédemment.

Covariates	Categories	HR	95% CI of HR		p value
			Lower	Upper	
Age (years)	19-34	1.00	NA	NA	<0.0001*
	35-49	1.76	1.56	2.00	<0.0001
	50-64	2.57	2.27	2.90	<0.0001
	65-74	3.84	3.38	4.35	<0.0001
	≥75	5.46	4.80	6.22	<0.0001
Sex	Male	1.00	NA	NA	<0.0001*
	Female	0.92	0.88	0.95	<0.0001
Marital Status	Separated, divorced, widowed	1.00	NA	NA	<0.0001*
	Married	0.86	0.82	0.90	<0.0001
	Never married	0.90	0.84	0.97	0.0037
	Unknown	0.81	0.72	0.92	0.0011
Race	Non-Hispanic Caucasian	1.00	NA	NA	<0.0001*
	Non-Hispanic African American	0.95	0.87	1.04	0.2458
	Hispanic	0.87	0.81	0.93	<0.0001
	Asian/Other	0.79	0.72	0.88	<0.0001
Region	Northeast	1.00	NA	NA	<0.0001*
	Midwest	1.26	1.18	1.36	<0.0001
	South	1.19	1.12	1.27	<0.0001
	West	1.27	1.20	1.34	<0.0001
Tumor location	Supratentorial	1.00	NA	NA	0.0696
	Infratentorial	0.96	0.79	1.17	0.6883
	NOS	1.07	1.01	1.13	0.0298
Laterality	Bilateral	1.00	NA	NA	<0.0001*
	Left	0.66	0.51	0.85	0.0016
	Right	0.65	0.50	0.84	0.0009
	NOS	0.73	0.56	0.95	0.0180
Tumor size	0-3 cm	1.00	NA	NA	<0.0001*
	3-6 cm	1.11	1.06	1.17	<0.0001
	>6 cm	1.26	1.17	1.35	<0.0001
	Unknown	1.13	1.06	1.20	0.0001
Radiation	Radiation after surgery	1.00	NA	NA	<0.0001*
	Other	2.07	1.98	2.16	<0.0001
Types of surgery	Gross total resection	1.00	NA	NA	<0.0001*
	Biopsy	1.19	1.13	1.25	<0.0001
	Partial resection	1.39	1.33	1.45	<0.0001

Tableau 3: Facteurs pronostiques cliniques des GBM (issu de Pan *et al.*, 2015)

- Concernant les facteurs moléculaires, on peut s'appuyer sur une étude récente qui a étudié 304 publications et 174 études concernant 14678 patients de 33 pays différents (Tableau 4). Cette étude a alors différencié les facteurs moléculaires en « clairement

pronostic », « faiblement pronostic », « non pronostic » et « prometteur ». Cette dernière catégorie faisant référence aux marqueurs pour lesquels des études supplémentaires sont nécessaires pour attester de leur valeur pronostique (Thuy *et al.*, 2015). Les gènes MGMT et IDH semblent les plus importants à considérer. Cependant, cette étude, bien que très informative peut être remise en question. En effet, une étude menée sur 144 patients, démontre une corrélation forte entre l'agressivité radiologique et clinique des GBM avec le statut de l'EGFR (Tini *et al.*, 2015).

Category	Factor	Studies	Patients	MSD, months	p value
Clearly prognostic	MGMT	29	2681	+3.61	1.27E-09
	IDH	6	1114	+14.74	2.26E-06
Weakly prognostic	LOH Chr 10/10q	14	1300	-1.65	1.48E-04
	Ki67	20	1099	-2.18	0.027
Non-prognostic	EGFR	34	3531	+0.15	0.041
	p53	33	3119	+0.27	0.119
	CDKN2A	10	1078	-0.19	0.740
	PTEN	9	869	-0.34	0.760
Promising	1p19q del	3	564	+7.7	0.005*
	MAPK	5	414	-5.9	4.36E-08
	Rb	4	360	-4.26	0.004
	hTERT	2	333	-4.9	0.002
	p-p70s6k	2	324	-18.33	9.69E-06
	p-Akt	2	324	-11.5	0.002
	PCNA	3	233	-3.88	0.003
	PI3K	2	194	-49.9	2.00E-04*
	BAX	2	173	+4.9	7.23E-04
	Survivin	3	169	-18.0	2.94E-07
	Cathepsin	2	140	-4.2	1.31E-04
	EphA2	2	53	-10.3	0.004
	Ras	2	34	-3.03	0.020

Tableau 4: Facteurs pronostiques moléculaires (issu de Thuy *et al.*, 2015)

De plus, les classifications moléculaires précédemment abordées permettent d'obtenir des informations pronostiques. Par exemple, les GBM mutés pour MGMT sont plus sensibles au TMZ. De ce fait, la MST des GBM avec MGMT muté est de 21.7 mois contre 15.3 mois si MGMT est dans sa version sauvage (Karsy *et al.*, 2015). La mutation du gène IDH1/2 est associée au sous-type des GBM secondaires proneuraux défini par Verhaak, or cette mutation est aussi associée à un meilleur pronostic (26.6 mois contre 14.5 mois pour IDH1/2 sauvage) (Labussière *et al.*, 2014).

Ainsi, on peut définir les GBM comme un ensemble hétérogène de tumeurs qui, malgré des ressemblances histologiques, ont un comportement différent en fonction des mutations qu'ils présentent. Chaque sous-ensemble répond donc plus ou moins aux différents traitements, influant de ce fait le pronostic. La prochaine classification des gliomes, plus axée sur les marqueurs moléculaires, permettra alors une personnalisation de la thérapie qui bénéficiera, de ce fait, aux patients.

Le pronostic des GBM reste donc très réservé et ce malgré les progrès dans toutes les modalités de traitement. L'arrivée de nouvelles molécules comme le BEV semble prometteuse mais le bénéfice en reste faible. C'est dans ce contexte que de nouveaux agents thérapeutiques peu conventionnels émergent au fil des années. C'est le cas des virus oncolytiques qui pourraient représenter une des options de traitement des gliomes, et plus particulièrement des GBM, à l'avenir.

## **I.2. Utilisation des virus oncolytiques dans la thérapie des gliomes**

### **I.2.1 La naissance de virus oncolytiques**

C'est en 1898 que le concept de virus émergea dans le monde scientifique. En effet, les travaux de Beijerinck sur la maladie de la mosaïque du tabac associés à ceux de Loeffler et Frosch sur le syndrome main-bouche-pied (Bos, 1999) ont permis de mettre en évidence un agent particulier. Cet agent était capable de traverser un filtre retenant tous les micro-organismes connus jusque-là : ces agents seront ensuite appelés virus. Avant même que le concept du virus ne soit né, des rapports faisaient état de la disparition de cancers à la suite d'une infection : le plus célèbre est celui de Dock *et al.* datant de 1896 (Dock, 1904). Il y décrit une femme de 42 ans présentant une leucémie myéloïde, entrée en rémission à la suite d'une infection de type Influenza (le virus sera isolé 37 ans plus tard). En effet, cette femme présentait une splénomégalie, une hépatomégalie et une leucocytose sévère qui ont alors disparu après la déclaration de la maladie. Ce cas fut le premier d'une longue série où des corrélations fortes furent établies entre des infections virales et des guérisons tumorales (Bierman *et al.*, 1953; Kelly and Russell, 2007; Pelner *et al.*, 1958). Par exemple, des leucémies (Gross, 1971; Pasquinucci, 1971), des lymphomes d'Hodgkin (Mota, 1973) ou de Burkitt (Bluming and Ziegler, 1971) ont régressé suite à des infections par le virus de la rougeole. Les virus de l'hépatite B ou de la mononucléose infectieuse ont aussi été impliqués dans la rémission de cancers (Kelly and Russell, 2007).

Il fallut ensuite attendre 50 ans pour que les travaux de Hoster *et al.* remettent la virothérapie anticancéreuse au goût du jour. En effet, en 1949, deux cas de rémission de lymphome de Hodgkin (LH) à la suite d'une hépatite virale furent décrits. C'est donc dans ce

cadre que 22 patients atteints de ce même cancer ont participé à un essai clinique portant sur l'efficacité de l'Hépatite virale dans le traitement du LH ; parmi ces patients, 7 entrèrent en rémission. Le diagnostic de LH était alors fondé sur des signes cliniques associés à un examen anatomo-pathologique des nœuds lymphatiques. La rémission fut considérée lors d'une diminution ou d'une disparition de signes cliniques associés au LH (splénomégalie, douleur, adénomégalie) et/ou des données de l'hémogramme (lymphopénie, monocytose) pendant au moins un mois (Hoster *et al.*, 1949). Cette étude, bien qu'éthiquement critiquable a permis de toucher du doigt l'intérêt que pouvaient présenter certains virus dans le traitement du cancer. Cependant, les 13 patients qui ont développé une hépatite (dont 1 mort) ont aussi mis en relief un réel besoin d'innocuité du virus avant d'envisager son utilisation en tant qu'agent thérapeutique.

C'est durant cette même période que les études d'Alice Moore et Chester Southam sur des modèles animaux associées à des essais cliniques ont vraiment fait émerger l'idée d'un virus oncolytique (VO), c'est-à-dire un virus capable de détruire les cellules cancéreuses en épargnant au maximum les cellules saines. Par exemple, plusieurs publications de Moore *et al.* ont insisté sur l'efficacité du virus de l'encéphalite à tiques sur des sarcomes murins (Moore and O'connor, 1950), et sur des xénogreffes sur souris de diverses tumeurs humaines (Moore, 1951).

Entre 1950 et 1970, de nombreux virus humains furent testés (Adénovirus, Herpesvirus, Paramyxovirus, Picornavirus) (Kelly and Russell, 2007), à la fois sur modèles rongeurs et sur patients volontaires. Cependant, le manque d'innocuité de ces virus poussa certains auteurs à se concentrer sur des virus animaux. En effet, les travaux de Moore sur un virus humain capable de détruire des cellules murines permettaient d'envisager l'existence d'un tropisme viral particulier pour les cellules tumorales qui dépassait la barrière d'espèce. Hammon découvrit 6 virus animaux capables de détruire des cellules tumorales humains *in vitro* (Hammon *et al.*, 1963). Parmi ces 6 virus isolés, deux herpesvirus (virus de la rhinopneumonie équine et de la rhinotrachéite bovine) se sont montrés capables de détruire au moins une lignée cellulaire de cancer humain implanté chez la souris (Yohn *et al.*, 1968). De plus, le potentiel oncolytique de quelques virus aviaires fut testé et le plus prometteur fut le NDV (Newcastle Disease Virus). En effet, malgré la mort des modèles rongeurs utilisés, le virus entraîna la régression de la tumeur dans la plupart des cas (Cassel and Garrett, 1965) et reste, encore aujourd'hui, un des virus oncolytiques les plus étudiés (Cf. infra). A partir des années 70, les recherches sur les virus diminuèrent car très peu de virus étaient réellement efficaces et sans danger *in vivo* (Tableau 5).



L'avènement de la biologie moléculaire fut un tournant dans la recherche sur les VO et plusieurs auteurs utilisèrent des virus recombinants afin d'optimiser leur sélectivité envers les cellules tumorales tout en épargnant les cellules normales. Martuza fut le premier à utiliser des virus génétiquement modifiés en tant que VO. Il montra qu'un herpes virus (HHV1) délété du gène codant pour la thymidine kinase (TK) était capable de se multiplier dans les cellules en division mais pas les autres. Martuza utilisa ensuite cette propriété afin de traiter des souris sur lesquelles des gliomes avaient été implantés par injection intracérébrale. Ce virus fut capable d'éradiquer les gliomes chez les souris traitées bien que des encéphalites se soient développées chez plusieurs animaux (Martuza *et al.*, 1991).

La recherche sur les VO a donc réellement commencé vers 1950 bien que plusieurs années auparavant l'intérêt des virus dans la thérapie anti-cancéreuse fut déjà pointé du doigt (Tableau 5). Aujourd'hui, grâce aux progrès considérables de la recherche, les virus préalablement décrits ainsi que de nouveaux virus sont étudiés dans l'espoir de trouver les meilleurs candidats possibles à la virothérapie oncolytique.

Year(s)	Virus	Disease	No. of patients	Administration	Outcome	Side effect
1949	Hepatitis B virus <sup>32</sup>	Hodgkin's disease	22	Parenteral injection of unpurified human serum, tissue extract	14/22 developed hepatitis; 7/22 improved in clinical aspect of disease; 4/22 reduction in tumor size	Fever, malaise, death (1 confirmed)
1952	Egypt 101 virus (early passage West Nile) <sup>36</sup>	Advanced, unresponsive neoplastic disease	34	IV, intramuscular injection of bacteriologically sterile mouse brain, chick embryo, human tissue	27/34 infected; 14/34 oncotropism; 4/34 (transient) tumor regression	Fever, malaise; mild encephalitis (2 confirmed)
1956	Adenovirus adenoidal-pharyngeal-conjunctival virus (APC) <sup>30</sup>	Cervical carcinoma	30	IT, IA, IV injection of TC supernatant	26/40 inoculations resulted in localized necrosis	Vaginal hemorrhage; infrequent (3/30) fever, malaise
1974	Mumps virus (wild-type, non-attenuated) <sup>36</sup>	Terminal cancers; gastric, pulmonary, uterine account for more than 50%	90	External post-scarification; IT; IV; oral; rectal; inhalation of purified human saliva or TC supernatant	37/90 complete regression or decrease >50%; 42/90 decrease <50% or growth suppression; 11/90 unresponsive	7/90 adverse reactions: bleeding, fever

Abbreviations: IA, intra-arterial; IT, intratumoral; IV, intravenous; TC, tissue culture.

**Tableau 5:** Présentation de cas cliniques importants de l'histoire des virus oncolytiques (issu de Kelly et Russel, 2007)

## **I.2.2 Virus oncolytique : principe**

Au fil des années, la définition d'un VO s'est modifiée. Aujourd'hui on définit un VO comme un virus capable de se répliquer et de lyser sélectivement les cellules tumorales (oncolyse), tout en épargnant les cellules saines adjacentes (Prestwich *et al.*, 2008). On les différencie des virus incapables de se répliquer qui servent de vecteurs et sont utilisés en thérapie génique. Un des intérêts majeurs des virus en thérapie anti-cancéreuse est leur capacité à se multiplier, et donc, à auto-amplifier leur action. Autrement dit, il n'est pas nécessaire d'infecter toutes les cellules en une fois, puisque le virus va se multiplier et infecter les cellules au fur et à mesure du temps (Sze *et al.*, 2013). On différencie alors deux grands types de virus oncolytiques : les virus naturellement oncolytiques et les virus génétiquement modifiés.

### **I.2.2.1. Deux types de virus oncolytiques**

#### **a. Les virus naturellement oncolytiques**

Ces virus sont naturellement capables (sans modification génétique) de détruire sélectivement les cellules tumorales. Ce sont souvent des virus non ou peu pathogènes pour l'espèce-cible et donc à l'origine d'effets secondaires mineurs (Roberts *et al.*, 2006). Ainsi, la qualité principale de ces virus est l'innocuité. On peut alors citer l'herpesvirus, le virus de la rougeole, les réovirus et le NDV. Par exemple, le NDV entraîne une forte sécrétion d'IFN par les cellules normales, mais pas par les cellules cancéreuses, ce qui lui confère une grande spécificité (Schirmacher and Fournier, 2014).

#### **b. Les virus oncolytiques génétiquement modifiés (ou virus recombinants)**

Les modifications génétiques ont différents objectifs : (i) augmenter la sélectivité du virus pour les cellules tumorales, (ii) augmenter l'efficacité du virus (iii) limiter la pathogénicité du virus envers l'espèce cible. On peut alors citer l'exemple d'un poxvirus JX-594. Ce virus est issu de plusieurs modifications du virus de la vaccine (VACV). Le gène codant pour la TK a été délété. La protéine issue de ce gène est importante pour la multiplication dans les cellules saines mais ne l'est pas pour les cellules tumorales : la délétion augmente donc la sélectivité du

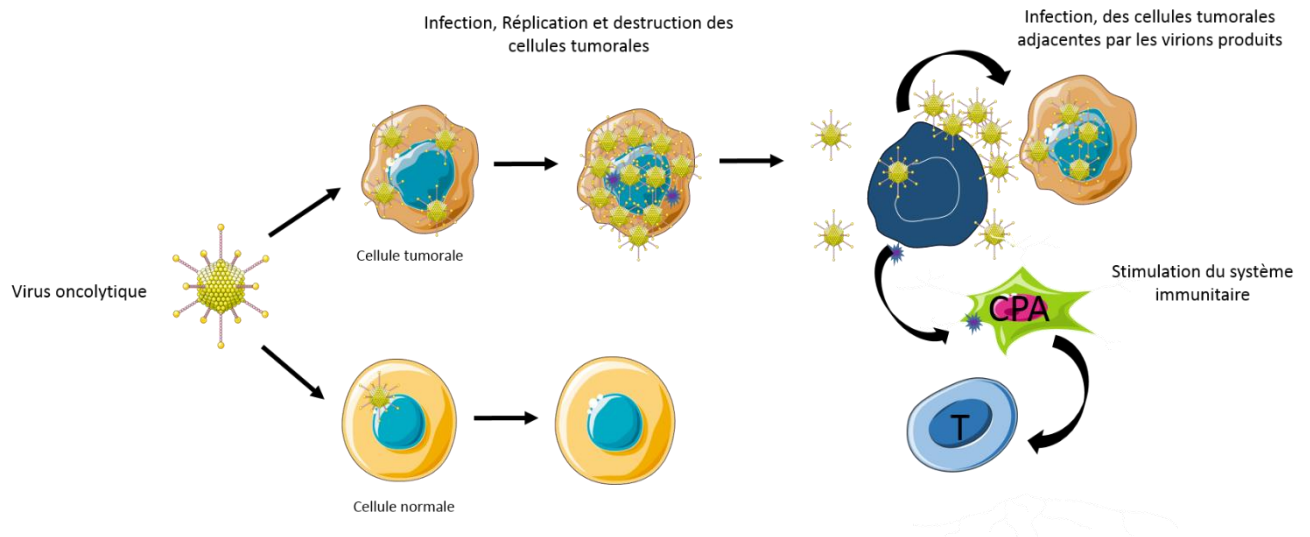
virus. De plus, un gène codant pour la protéine GM-CSF (Granulocyte Macrophage Stimulating Factor) a été inséré afin de stimuler l'immunité anti-tumorale : cela qui permet d'augmenter l'efficacité du virus. Enfin, un gène codant pour la  $\beta$ -galactosidase a été ajouté afin de repérer la présence du virus dans l'organisme (Mastrangelo *et al.*, 1999).

Il est aussi possible de modifier génétiquement des virus naturellement oncolytiques afin d'augmenter leur efficacité tout en permettant une innocuité maximale comme cela a été fait avec le NDV par exemple (Schirmacher and Fournier, 2014).

### **I.2.2.2. Une stimulation de la réponse immunitaire**

Plus que lyser les cellules tumorales, l'utilisation des VO permet de stimuler la réponse immunitaire (RI) par différents mécanismes (Li *et al.*, 2008) (Fig.8) :

- La présentation d'antigènes spécifiques de tumeurs (TAA) consécutive à leur libération suite à la lyse cellulaire
- L'inflammation locale induite par l'infection virale qui augmente l'afflux de lymphocytes T.
- L'expression de protéines stimulant le système immunitaire (SI) par des virus recombinants (exemple : GM-CSF et JX-594)
- Destruction des cellules tumorales en épargnant les cellules immunitaires du microenvironnement tumoral, à l'inverse de la chimiothérapie et de la radiothérapie.



**Figure 8:** Schéma explicatif du principe des virus oncolytiques (inspiré de Sze *et al.*, 2013)

Le virus oncolytique infecte la cellule tumorale mais préserve la cellule normale. La cellule tumorale est alors détruite. La lyse tumorale entraîne la libération des virions capable d'infecter les cellules tumorales adjacentes, et la libération des antigènes spécifiques de la tumeur qui vont ensuite être reconnus par les CPA qui va ensuite les présenter aux lymphocytes T. Cette réponse immunitaire est amplifiée par la présence du virus dans le microenvironnement tumoral (Abréviations : CPA : cellule présentatrice d'antigène, T : lymphocyte T).

La lyse spécifique des cellules tumorales ainsi que la stimulation du SI sont donc les deux principales propriétés des virus oncolytiques qui en font un agent thérapeutique de choix dans la lutte contre le cancer. Nous allons nous concentrer ici sur l'utilisation des VO dans le traitement des gliomes et plus particulièrement des GBM.

### **I.2.3 Utilisation des virus oncolytiques dans le traitement des gliomes**

Dans le cadre du traitement contre les gliomes, de nombreux VO sont étudiés afin de trouver le meilleur candidat. Parmi ces virus, certains semblent prometteurs et sont même déjà impliqués dans des essais cliniques sur l'Homme. Dans cette partie nous allons nous concentrer sur ces virus les plus aboutis et nous verrons quelles peuvent être les limites de leur utilisation.

#### **I.2.3.1. Herpes simplex virus**

##### **a. Intérêt du virus**

L'Herpes simplex virus 1 ou Human Herpes Virus 1 (HHV1) est un virus à ADN double brin de la famille des *Hespeviridae* à l'origine de symptômes mineurs chez l'Homme

(stomatite, kératite). La caractéristique principale est sa capacité à entrer en latence. Cette latence semble à l'origine de sa forte prévalence puisque les deux tiers de la population sont séropositifs pour l'HHV1. De plus, le HHV1 possède un neurotropisme naturel qui en fait un virus intéressant dans la thérapie des tumeurs intracrâniennes comme les gliomes.

L'HHV1 a été l'un des premiers virus à être étudiés à des fins oncolytiques. En 1991, Martuza *et al.* (Martuza *et al.*, 1991) ont mis au point un virus mutant d'HHV1 déficient pour la TK capable d'épargner les cellules qui se divisent peu et de détruire les cellules cancéreuses à la fois *in vitro* (lignée cellulaire de glioblastome humain U87) et *in vivo* sur des souris immunodéprimés ayant subi une injection intracrânienne de ces cellules U87. Ceci fut la première preuve de la capacité oncolytique de l'HHV1.

### **b. Des virus oncolytiques atténués**

Depuis, de nombreux autres mutants ont été conçus : R3616, HSV-1716, hrR3, G207 et G47 $\Delta$  sont les plus étudiés dans le cadre des GBM. L'objectif de ces virus est alors de diminuer la neurovirulence afin d'en faire un candidat idéal pour traiter les gliomes. Un, puis deux, puis trois gènes ont alors été délétés afin d'augmenter l'innocuité du virus, on différencie alors 3 générations de virus :

- Les virus de première génération (R3616 et HSV-1716) qui présentent une délétion du gène  $\gamma_{134.5}$  (Chou *et al.*, 1990) codant pour une protéine ICP34.5 à l'origine de la déphosphorylation de eIF2 $\alpha$ . L'absence de cette protéine entraîne un arrêt de la synthèse protéique dans la cellule « normale » infectée. A l'inverse, la cellule tumorale, qui présente une altération de sa réponse antivirale permet la réplication du virus malgré la délétion de ce gène (Braidwood *et al.*, 2013). De plus, Verpooten *et al.* en 2009, ont montré que ce gène était indispensable à la neuro-invasion (Verpooten *et al.*, 2009) et donc à la neurovirulence.
- Les virus de seconde génération (hrR3 et G207) présente, en plus, la délétion du gène U<sub>L</sub>39 qui code pour une ribonucléotide réductase (RR) qui permet la multiplication du virus dans des cellules qui ne sont pas en division (Yamada *et al.*, 1991) : sa délétion permet donc théoriquement d'empêcher la multiplication du virus dans des cellules normales, à l'inverse des cellules tumorales pour lesquelles la RR est présente en quantité importante. Pour le virus G207, un gène rapporteur lacZ a été inséré au sein du gène U<sub>L</sub>39, empêchant de ce fait sa transcription (Mineta *et al.*, 1995).

- Les virus de troisième génération (G47Δ) pour lesquels une délétion du gène  $\alpha 47$  codant pour la protéine ICP47 a été ajoutée (la séquence de ce gène se recoupe avec le promoteur US11) : cette délétion permet d'augmenter la présentation des antigènes de classe I et l'infiltration par les lymphocytes T au sein de la tumeur. En outre cette délétion est à l'origine d'une répllication virale amplifiée et plus rapide (Todo *et al.*, 2001). Ce virus est alors aussi inoffensif que les virus de 2<sup>ème</sup> génération mais présente une efficacité accrue.

### c. Des virus « armés »

A partir de ces virus inoffensifs, des éléments ou « transgènes » visant à augmenter l'efficacité anti-tumorale peuvent être ajoutés: on les appelle les virus « armés ». Plusieurs objectifs sont visés par ces transgènes :

- Augmenter l'action immuno-stimulatrice : De nombreuses cytokines comme l'interleukine 18 (IL-18), IL-9, IL-4 ou GM-CSF ont été étudiées (Todo, 2008) mais c'est l'utilisation de l'interleukine 12 (IL-12) qui semble être la plus prometteuse. L'IL-12, capable de stimuler la réponse anti-tumorale, a été insérée à des virus de 1<sup>ère</sup> génération (M002 avec l'IL-12 murine et M032 avec l'IL-12 humaine). Le virus ainsi modifié est très efficace contre les gliomes *in vitro* et *in vivo* sur des modèles murins (syngéniques et xénogreffes) (Hellums *et al.*, 2005). Le transgène codant pour l'IL-12 a aussi été inséré sur un virus de 3<sup>ème</sup> génération (T-mfIL12) : ce virus semble très intéressant. Des injections de cellules tumorales (cellules Neuro2a) ont été réalisées sur des souris à deux endroits différents, une seule des deux tumeurs a ensuite été traitée avec le virus. Or, une activité anti-tumorale a été observée à la fois au sein de la tumeur traitée et au sein de la tumeur non traitée, évoquant une efficacité accrue du virus (Todo, 2008).
- Ajouter une action anti-angiogénique : Liu *et al.* ont construit un virus exprimant le platelet factor 4 (PLF4) à partir du virus G47Δ (bG47Δ-PF4). Le PLF 4 est capable d'inhiber la prolifération des cellules endothéliales à l'origine d'une diminution de la croissance tumorale par effet anti-angiogénique comme cela a été montré sur le cancer colorectal (Belman *et al.*, 1996). Le virus bG47Δ-PF4 est toujours capable de se répliquer au sein d'une lignée cellulaire de gliome humain, mais peut aussi diminuer la prolifération des cellules endothéliales. Cette propriété semble liée à une inhibition de

la croissance tumorale (injection sous-cutanée de gliome humain sur souris immunodéprimées), et permet une augmentation de la survie des souris utilisées.

- Augmenter l'efficacité en utilisant des gènes suicides. Le principe de cette stratégie est d'utiliser une enzyme produite par le virus (naturellement ou après insertion d'un gène codant pour l'enzyme d'intérêt) afin de produire une substance active à partir d'une prodrogue injectée par voie systémique. Plusieurs virus ont alors été conçus : le HHV1 contient une TK capable d'activer la prodrogue Gangiclovir, mais les études sur modèles murins de gliomes ont été décevantes (Todo *et al.*, 2000). D'autres virus armés d'un gène suicide ont été testés sur des modèles de gliomes avec plus de réussite. En effet, le cytochrome p450 2B1 et la carboxyestérase intestinale humaine sont capables d'activer le cyclophosphamide et l'irinotecan respectivement. L'insertion du gène codant pour ces enzymes est l'origine d'un effet anti-tumoral accru sur des modèles murins immunodéprimés de gliomes. Ces virus sont donc un moyen de combiner chimiothérapie ciblée et virothérapie.

De plus, l'ensemble de ces virus, armés ou non, peuvent être utilisés en combinaison avec des thérapies conventionnelles comme la chimiothérapie, la radiothérapie et la chirurgie afin d'augmenter leur efficacité (Braidwood *et al.*, 2013).

#### **d. Une innocuité confirmée par les essais cliniques**

L'innocuité des virus oncolytiques est une caractéristique majeure et doit être évaluée à la fois sur des modèles animaux mais aussi sur l'Homme avant d'envisager leur utilisation en tant qu'agent thérapeutique. Cette propriété est d'autant plus importante pour l'HHV1 qui est pathogène chez l'Homme et qui présente un tropisme cellulaire varié (Shen and Nemunaitis, 2006). Après des essais prometteurs sur les rongeurs, quelques herpesvirus oncolytiques ont été testés chez l'Homme afin d'attester de leur innocuité (Tableau 6).

Les deux virus, G207 et HSV-1716, ont déjà été testés lors d'essais cliniques de phase I et II, les essais de phase III sont en cours (clinicaltrials.gov) dans le cadre de la thérapie du GBM.

Pour le virus G207, Markert *et al.* ont publié les résultats des essais de phase I en 2000 (21 patients) (Markert *et al.*, 2000), 2009 (6 patients) (Markert *et al.*, 2009) et 2014 (9 patients)



(Markert *et al.*, 2014). Dans les trois cas, le virus a été injecté dans la tumeur à l'aide d'un cadre stéréotactique ou lors de la résection de la tumeur. Trois régimes d'administration ont alors été étudiés : augmentation progressive de la dose (2000), combinaison à la résection de la tumeur (2009) et combinaison avec la radiothérapie (2014). La dose maximale tolérée n'a pas été atteinte dans l'étude de 2000 bien que  $3 \cdot 10^9$  UFP (Unité Formant Colonie) ait été injectées. Dans tous les cas, aucun signe d'encéphalite (clinique, IRM, analyses de laboratoire) n'a été objectivé bien que quelques effets secondaires notables aient été observés (maux de tête, nausées, hémiparésie, anxiété), sans qu'un lien direct avec l'injection du virus n'ait été clairement démontré.

Pour HSV-1716, trois essais cliniques de phase I ont été menés. A l'image du virus G207, la première étude de 2000 (9 patients) consistait en une augmentation progressive de la dose injectée à l'aide d'un cadre stéréotactique ( $10^3$ - $10^5$ ) ; la dose maximale tolérée n'a pas été atteinte évoquant alors l'innocuité du virus (Rampling *et al.*, 2000). En 2002 (12 patients), les injections intra-tumorales ont été réalisées 5-7 jours avant la résection de la tumeur et n'ont pas entraîné d'effets secondaires majeurs (Papanastassiou *et al.*, 2002). En 2004, Harrow *et al.* ont injecté le virus dans le parenchyme entourant le gliome à la suite de la résection de la tumeur et n'ont pas objectivé de toxicité due au virus (Harrow *et al.*, 2004).

#### **e. Une efficacité qui reste à déterminer**

Concernant le virus G207, l'étude de phase Ib a montré que le virus ne se répliquait que chez 50% des patients traités (3/6) (Tableau 6). De plus, aucune réponse complète ni partielle n'a été observée (critère IRM : plus de 50% de diminution de prise de contraste après l'injection du virus) (Markert *et al.*, 2009). Il semble possible que le SI soit impliqué dans ce manque d'efficacité. En effet, le patient présentant la plus longue survie est celui pour lequel la réplication virale est la plus forte mais aussi celui pour lequel l'infiltration par les lymphocytes est la plus faible. De plus, l'étude de 2014 ne montre qu'un seul patient avec une réponse partielle (Markert *et al.*, 2014). Dans tous les cas, les MST atteintes avec le virus ne sont pas différentes de celles obtenus avec une thérapie conventionnelle.

De la même façon, le virus HSV-1716 a conservé son infectivité une semaine après injection chez seulement deux patients sur 12. Il est alors intéressant de noter que ces deux patients étaient séronégatifs pour l'HHV1 avant l'injection. Cependant, de l'ADN viral en quantité augmentée par rapport à l'injection a été retrouvé chez 10/12 patients évoquant alors une multiplication du virus, qui ne se prolonge malheureusement pas dans le temps



(Papanastassiou *et al.*, 2002). De plus, seulement 1 patient sur 12 a présenté une survie particulièrement élevée à la suite de l'injection du virus (Harrow *et al.*, 2004).

Même si la preuve de l'efficacité n'est pas l'objectif de ces études de phases I, il est important de noter que le virus ne semble pas améliorer significativement la survie des patients traités. Ceci nous pousse à croire que des optimisations supplémentaires sont nécessaires afin d'augmenter l'efficacité du virus. Il est aussi possible que chez l'Homme (à l'inverse des modèles rongeurs), ce virus soit, intrinsèquement, d'une efficacité limitée dans le cadre du traitement des gliomes. D'autres essais cliniques sont en cours ou en projet et vise à attester l'innocuité des virus de 3<sup>ème</sup> génération ou des virus armés (Wollmann *et al.*, 2012).

Le HHV1 est donc un candidat intéressant en tant qu'agent oncolytique et de très nombreuses stratégies sont développés afin d'augmenter son innocuité et son efficacité. Cependant, les premiers essais cliniques ne mettent pas en évidence une efficacité significative des virus de 1<sup>ère</sup> et de 2<sup>ème</sup> génération.

Type de virus	Phase de l'étude	Nombre de patients	Protocole	Toxicité	Efficacité
HSV G207 (Markert <i>et al.</i> , 2000)	I	21	Unique injection de $1.10^6$ - $3.10^6$ UFP injection IT	Absente (quelques effets secondaires)	Diminution du volume de la tumeur chez 8 patients MST = 15,9 m
HSV G207 (Markert <i>et al.</i> , 2009)	Ib	6	Deux doses de $1,5,10^9$ UFP IT avant et après résection	Absente : Quelques effets secondaires légers et modérés (un patient avec sévères : fièvre, délire, hémiparésie)	Aucune réponse MST = 23 m
HSV G207 (Markert <i>et al.</i> , 2014)	I	9	Deux doses ( $1,10^9$ au total) IT suivi par radiothérapie le jour suivant	Absente, Effets secondaires légers et modérés (3 patients avec sévères : convulsions)	3 réponses (diminution de la taille de la tumeur évaluée par IRM) MST = 18,7 m
HSV 1716 (Rampling <i>et al.</i> , 2000)	I	9	Une seule injection $10^3$ - $10^5$ UFP IT	Absente	4 réponses (survie après 15-24 mois), MST = NE
HSV 1716 (Papanastassiou <i>et al.</i> , 2002)	I	12	Une seule injection $10^5$ UFP IT + chirurgie (5-7 jours plus tard)	Absente: pas d'effet secondaire rapporté	Virus resté infectieux chez 2/12 patients MST = NE
HSV 1716 (Harrow <i>et al.</i> , 2004)	I	12	Une seule injection $10^5$ UFP IT + chirurgie (le jour de l'injection)	Absente : quelques effets secondaires a priori non relié au virus	3 réponses (survie 15, 18 et >22 mois), MST = NE

Tableau 6: Essais cliniques utilisant l'HSV1 (inspiré de Wollmann *et al.*, 2002) (Abréviations : IT = intratumorale, m = mois, PFY = Plaque Forming Unit, MST = médiane de survie)

### **I.2.3.2. Adenovirus**

#### **a. Intérêt en tant que VO**

Les adénovirus sont des virus à ADN non enveloppés à l'origine de symptômes respiratoires modérés chez l'Homme. D'abord étudiés en tant que vecteur en thérapie génique grâce à leur innocuité et leur facilité de manipulation, les adénovirus sont rapidement devenu les virus oncolytiques les plus étudiés (Jiang *et al.*, 2009). En effet, des modifications génétiques de l'adénovirus de sérotype 5 (Ad5) ont permis de créer des virus dont la réplication se fait sélectivement au sein des cellules tumorales (Wollmann *et al.*, 2012).

#### **b. Différents types d'Adénovirus oncolytiques**

##### *i. Deux protéines à l'origine de la sélectivité tumorale : les virus de première génération*

Deux protéines sont d'intérêt majeur et permettent au virus de se multiplier dans de nombreuses cellules, leur délétion permet alors de donner au virus sa sélectivité pour les cellules tumorales. En effet, la protéine virale E1A déclenche le début de la phase S au sein des cellules infectées, grâce à son interaction avec la protéine du Rb et la protéine p300. Cette mitose est indispensable à la multiplication du virus. La protéine virale E1B, quant à elle, inhibe l'apoptose dans les cellules hôtes en se liant et en inactivant la protéine p53. Or Rb et p53 étant des protéines issues de gènes suppresseurs de tumeur, elles sont souvent absentes ou non fonctionnelles au sein des cellules tumorales. Ainsi la création d'un virus inapte à produire E1A et/ou E1B permet de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses (Wollmann *et al.*, 2012).

#### **ONYX-15 : délétion de E1B**

Le premier adénovirus utilisant cette propriété est le virus appelé ONYX-15 (Bischoff *et al.*, 1996) issu d'un Ad 5 délété du gène codant pour E1B. Ce virus s'est alors révélé capable de lyser les cellules de gliomes présentant un gène p53 muté (U373) mais pas les cellules avec p53 wild-type (U87) (Heise *et al.*, 1997). Cependant, ce résultat a été contredit un an plus tard (Rothmann *et al.*, 1998) par Rothmann *et al.* qui ont alors montré que le statut de p53 n'influe pas la permissivité des cellules (y compris pour U87). L'utilisation du virus ONYX-15 sur des modèles de xénogreffes sous-cutanées de gliomes lui donna raison puisque, quel que soit le statut de p53, le virus était capable de réduire la croissance des tumeurs implantés (Georger *et*

*al.*, 2002). D'autres mécanismes sont donc impliqués dans la sélectivité d'ONYX-15 pour les cellules tumorales.

### **Ad-Δ24 : délétion de E1A**

Le virus Ad-Δ24 porte une délétion de 24 paires de base du gène codant pour la protéine E1A, devenue alors non fonctionnelle. Ce virus est capable de détruire des lignées cellulaires de gliomes humains, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* sur des modèles de xénogreffes sous-cutanées (Fueyo *et al.*, 2000). Cependant, il semble que ce virus soit réellement dépendant du statut de la protéine Rb comme l'ont montré Fueyo *et al.* Il apparaît particulièrement intéressant dans la thérapie du gliome car 20-50% (selon les études) des GBM présentent une inactivation de Rb (Puduvalli *et al.*, 2000). Cependant, l'efficacité de ce virus n'est pas équivalente sur toutes les lignées cellulaires de gliomes (Fueyo *et al.*, 2003).

#### *ii. Augmenter la sélectivité : les virus de deuxième et troisième génération*

Même si la délétion d'E1B est historiquement la plus importante, il semble que celle d'E1A ait été préférée par la communauté scientifique. Cette préférence semble logique comme le montrent Jiang *et al.* (2005), puisqu'*in vitro* et *in vivo*, les virus présentant une délétion du gène E1A sont plus efficaces sur les gliomes. Bien que d'autres constructions soient possibles, les virus Ad-Δ24-RGD et ICOVIR 5 sont les plus étudiés dans le cadre des traitements des gliomes.

### **Ad-Δ24-RGD : virus de 2<sup>ème</sup> génération**

A partir des difficultés de l'Ad-Δ24 à infecter de façon équivalente différentes cellules de gliomes, un nouveau virus optimisé a été construit et semble très efficace contre les gliomes. Cette nouvelle approche est fondée sur le fait que l'entrée d'un adenovirus dans une cellule cancéreuse est subordonnée à l'ancrage du virus au récepteur coxsackie-adenovirus (CAR). Or ce récepteur n'est pas toujours présent à la surface des cellules tumorales (Barnett *et al.*, 2002) limitant alors l'efficacité du virus à certaines cellules. Un autre mécanisme permet l'entrée du virus : les interactions des protéines virales à motifs RGD aux intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  des cellules.

Par conséquent, Suzuki *et al.* ont inséré une séquence RGD-4C dont la protéine s'exprime à la surface d'un virus Ad- $\Delta$ 24 (Suzuki *et al.*, 2001). Le nouveau virus ainsi construit (l'Ad- $\Delta$ 24-RGD) est ainsi capable d'entrer dans les cellules ayant une forte ou une faible expression de CAR augmentant son spectre d'utilisation sur les gliomes. Fueyo *et al.* ont ensuite montré que ce virus était capable de détruire diverses lignées cellulaires de gliomes humains et permettait d'augmenter de façon significative la survie de souris immunodéprimées ayant subi une xéno greffe orthotopique de gliome humain (Fueyo *et al.*, 2003). Sur des modèles de gliomes murins immunocompétents, il a été montré que l'efficacité du virus résidait dans sa capacité à stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale. En effet, l'injection intratumorale de l'Ad- $\Delta$ 24-RGD déclenche la mise en place d'un environnement pro-inflammatoire au sein du gliome (macrophages F4/80+, lymphocytes T CD4 et CD8+, diverses cytokines) et l'utilisation d'un immunosuppresseur (dexaméthasone) empêche son activité anti-tumorale (Kleijn *et al.*, 2014).

### **ICOVIR -5 : un virus de 3<sup>ème</sup> génération**

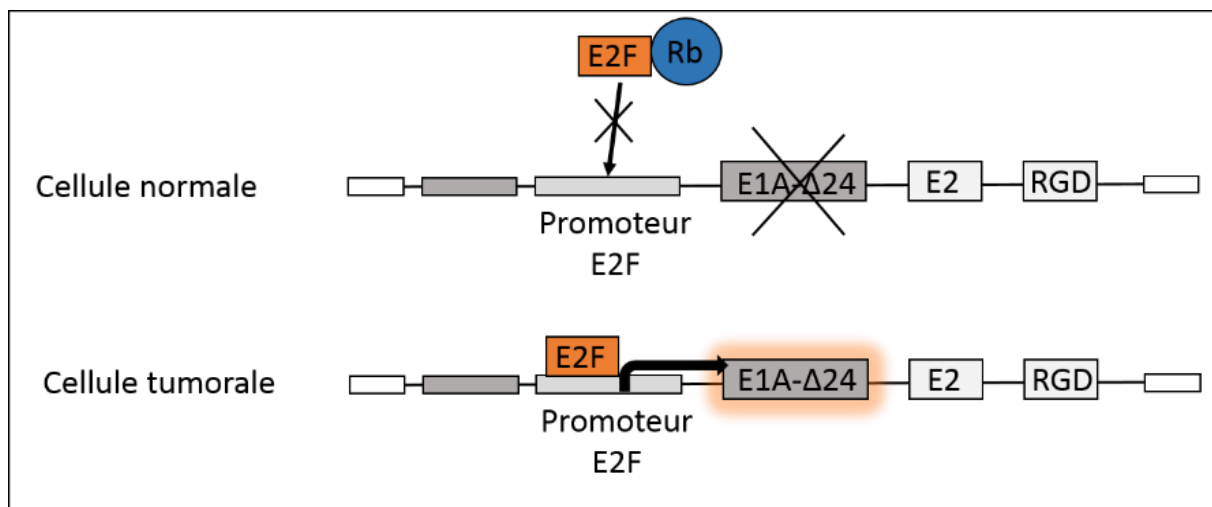
ICOVIR 5 est un virus de troisième génération car son concept repose sur l'Ad- $\Delta$ 24-RGD, lui-même de 2<sup>ème</sup> génération.

Ce virus recombinant utilise un élément de réponse à E2F1 en tant que promoteur du gène viral E1A. E2F est un facteur de transcription qui est surexprimé dans de nombreux gliomes et semble corrélée au pronostic (Alonso *et al.*, 2005). De plus, Rb étant responsable de l'inhibition de E2F, les cellules dépourvues de Rb présenteront une augmentation de E2F (Ahlander and Bosco, 2009). En outre, les promoteurs dépendants d'E2F sont actifs au sein des gliomes (Alonso *et al.*, 2007a). Le facteur de transcription E2F est donc présent en grande quantité au sein des cellules de gliomes.

Pour ICOVIR 5, la fixation du facteur de transcription E2F1 à son élément de réponse situé sur le génome viral, va permettre l'activation de la transcription de la protéine E1A au sein des cellules tumorales, amplifiant de ce fait la réplication du virus ainsi que sa sélectivité. En effet, les cellules saines ont des quantités beaucoup plus faibles d'E2F et ce dernier ne peut donc pas activer la transcription d'E1A. Ainsi, les cellules normales restent non permissives au virus (puisque E1A est absent) au contraire des cellules tumorales (Alonso *et al.*, 2007a) (Fig.9).

ICOVIR 5 a donc été testé avec succès sur plusieurs lignées cellulaires de gliomes *in vitro*. De plus, Alonso *et al.* ont montré que ce virus de 3<sup>ème</sup> génération augmentait la survie des souris immunodéprimées ayant subi une xéno greffe de gliomes humains (Alonso *et al.*, 2007a). Enfin, l'efficacité de ce virus peut être augmentée en ajoutant des agents de chimiothérapie

(RADD001 ou TMZ) comme cela a été montré sur des modèles rongeurs de gliomes (Alonso *et al.*, 2007b).



**Figure 9 :** Mécanisme d'action d'ICOVIR 5 (schéma simplifié à partir de Cascallo *et al.*, 2007).

Dans la cellule normale, la fixation de la protéine Rb au facteur de transcription E2F empêche ce dernier d'activer le promoteur inséré dans le génome du virus, ainsi le gène E1A n'est pas transcrit et la cellule peut facilement éliminer le virus.

Dans la cellule tumorale dépourvue de la protéine Rb, le facteur de transcription E2F se fixe à son promoteur et peut alors activer la transcription d'E1A capable d'augmenter la réplication du virus.

De nombreuses autres stratégies visant à augmenter la sélectivité ou l'efficacité des adenovirus dans le traitement des gliomes sont actuellement étudiées en phase préclinique. La plupart montre une efficacité intéressante *in vitro* ou sur des modèles rongeurs immunodéprimés ou immunocompétents (Ulasov *et al.*, 2014).

### c. Une innocuité intéressante mais remise en question

A l'image de l'HHV1 décrit précédemment, aucune étude menée sur les rongeurs ne fait état d'effets secondaires marqués dans le cadre de la thérapie des gliomes. De plus, des études ont montré l'innocuité de l'adénovirus oncolytique contre des astrocytes (Berghauer Pont *et al.*, 2015; Nandi *et al.*, 2009) et des fibroblastes normaux (Kang *et al.*, 2008). Un essai clinique de phase I-II a été mené sur 24 patients présentant des gliomes. Le virus ONYX-15 a été injecté autour de la tumeur après résection de celle-ci. ONYX-15, malgré une sélectivité jugée non idéale par la suite, a montré une réelle innocuité puisqu'aucun effet secondaire n'a été associé au virus (Chiocca *et al.*, 2004).

Cependant, des études ont conclu qu'une infection par un adenovirus de sérotype 12 pouvait être tumorigène chez le Hamster (Hohlweg *et al.*, 2003; Nakajima and Mukai, 1979).

De plus, la sélectivité du virus ONYX-15 envers les cellules à p53 mutée a été remise en question à la lumière des études de Georger *et al.* en 2002. Ces éléments, bien qu'anecdotiques, peuvent être un frein important au développement des adénovirus en tant qu'agent thérapeutique.

**d. Une efficacité qui reste encore à prouver**

Le seul essai clinique qui a été réalisé n'a pas permis de mettre en évidence une efficacité marquée du virus ONYX-15. En effet, parmi les 24 patients de l'étude, un seul n'a pas présenté de progression du gliome après 19 mois (Chiocca *et al.*, 2004). De plus, une étude a comparé l'utilisation des HHV1 à celle de plusieurs adénovirus dans la thérapie du gliome, sur des modèles murins. Il semble que l'HHV1 soit nettement supérieur (Hoffmann and Wildner, 2007). Un essai clinique de phase I-II est en cours afin de tester l'innocuité du virus Ad- $\Delta$ 24-RGD injecté par administration locale convective (CED) et d'obtenir des résultats préliminaires sur l'efficacité du virus : ce virus, très prometteur pourrait présenter une efficacité supérieure.

Les adénovirus, tout comme le HHV1 ont besoin de nombreuses manipulations génétiques afin d'assurer leur innocuité et leur sélectivité envers les cellules tumorales. D'autres virus, quant à eux, présentent ces propriétés à l'état naturel. Le virus de la maladie de Newcastle et les reovirus sont des exemples intéressants.

**I.2.3.3. Le virus de la maladie de Newcastle**

**a. Intérêt en tant que VO**

Le NDV est un virus aviaire à ARN négatif monobrin, de la famille des *Paramyxoviridae*. Ce virus n'est pas pathogène pour l'Homme puisqu'il n'est que rarement à l'origine de symptômes grippaux. Il est particulièrement intéressant à plusieurs titres : naturellement le NDV est capable de se répliquer au sein des cellules tumorales, de les lyser et d'amplifier la réponse immunitaire anti-tumorale (Fournier and Schirmacher, 2013). Ces propriétés sont obtenues sans modification génétique du virus.

Les interférons (IFN) sont des cytokines sécrétées par la plupart des cellules pour se défendre contre une infection virale, or cette propriété est perdue par de nombreuses cellules

tumorales. Krishnamurthy *et al.* (2006) ont alors montré que cette différence entre les cellules normales et cancéreuses était à l'origine de la sélectivité du NDV. Cependant, le NDV est capable d'infecter des cellules tumorales pour lesquelles la réponse aux IFN est active, évoquant alors d'autres propriétés à l'origine de sa sélectivité (Yaacov *et al.*, 2008). De plus, les cellules cancéreuses présentant une mutation de Ras (et/ou de Rac1) sont plus permissives (Puhmann *et al.*, 2010) : ceci est important dans le cadre des gliomes pour lesquels 50% des tumeurs ont une mutation du gène Ras (Nakada *et al.*, 2011).

L'infection par le NDV renforce les interactions entre les lymphocytes et les cellules tumorales, entraîne une surexpression de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité et la production de chémokines variées. Associé à ces mécanismes, le déclenchement de l'apoptose entraîne une stimulation du SI (Sinkovics and Horvath, 2000). Dans le cadre des gliomes de bas grade, l'induction importante de la production d'IFN de type I par les cellules du stroma est à l'origine d'une augmentation de la réponse anti-gliome, à l'inverse un déficit en IFN qui est associé à un mauvais pronostic (Fujita *et al.*, 2010). On comprend alors l'intérêt du NDV dans la thérapie des gliomes.

#### **b. Différents types de NDV oncolytiques présentant des innocuités et efficacités variées.**

Cinq souches de NDV ont été étudiées pour leur potentiel oncolytique sur les gliomes : PV701, 73-T, MTH-68H, NDV-HUJ et V4UPM. Selon leurs pathogénies sur les volailles, on peut les classer comme suit : (i) vélogéniques (hautement pathogènes) (ii) mésogéniques (modérément pathogène) et (iii) lentogéniques (très faiblement pathogènes, souvent des souches atténuées à but vaccinal).

##### *i. Des souches mésogéniques*

La souche PV701 s'est révélée efficace sur des modèles animaux et lors d'essais cliniques de phase I sur des tumeurs solides, mais n'a jamais été testée sur les tumeurs du SNC (Laurie *et al.*, 2006; Lorence *et al.*, 2007).

La première souche qui montra une efficacité sur les tumeurs du SNC fut 73-T qui s'est révélée efficace sur des modèles animaux de neuroblastomes en 1994 (Lorence *et al.*, 1994).

La souche MTH-68/H, initialement une souche vaccinale de la maladie de Newcastle utilisée sur la volaille (Sinkovics and Horvath, 2000), est, quant à elle, intéressante dans le cadre



des gliomes. En 1999, le cas d'un jeune garçon de 14 ans présentant un GBM et traité quotidiennement pendant 2 ans avec la souche de NDV MTH-68/H a été publié, et montré une efficacité du NDV en tant que virus oncolytique : le jeune garçon resta en rémission grâce au traitement (Csatary and Bakács, 1999). D'autres descriptions de cas ont suivi et ont aussi évoqué une réelle efficacité de cette souche de NDV dans le traitement des gliomes (survie entre 5 et 9 ans) (Csatary *et al.*, 2004). Deux ans plus tard, un autre cas de gliome (astrocytome anaplasique) fut traité avec succès avec la souche MTH-68/H associé à de l'acide valproïque, un antiépileptique et anti-cancéreux récent (Wagner *et al.*, 2006).

Malgré ces résultats intéressants, ces souches mésogéniques ne sont pas assez atténuées et peuvent être à l'origine d'effets secondaires sévères, notamment lors de la première injection intraveineuse (Laurie *et al.*, 2006; Lorence *et al.*, 2007).

## ii. Des souches lentogéniques

Les souches lentogéniques, atténuées, ont plus de difficulté à se répartir au sein d'un tissu et semblent donc plus sécuritaires que les souches mésogéniques. En 2006, (Freeman *et al.*, 2006) ont mené un essai clinique de phase I-II sur l'utilisation de la souche NDV-HUJ dans la thérapie du GBM après injection intraveineuse. Parmi les 11 patients de l'étude aucun n'a développé des effets secondaires graves en lien avec le virus. Cependant, seul un patient a présenté une rémission complète qui n'a duré que 3 mois. Bien qu'encourageant, ces résultats ne permettent pas d'attester de l'efficacité du virus (Freeman *et al.*, 2006).

La souche V4UPM utilisée comme vaccin aviaire est aussi très prometteuse en tant que virus oncolytique. En effet, *in vitro*, le virus est capable de détruire plusieurs lignées cellulaires de gliomes humains. De plus, cette souche entraîne une régression complète de la tumeur chez des souris immunodéprimées ayant subi une xénogreffe (Zulkifli *et al.*, 2009). *Ex vivo*, sur des cellules primaires de GBM humains cultivées dans un liquide cérébro-spinal artificiel (*ex vivo* glioma acute slice: EGAS), cette souche s'est aussi révélée intéressante. En effet, en lien avec la surexpression de la protéine Rac1, le virus V4UPM a entraîné une diminution drastique de la viabilité cellulaire après 48 heures, mais ces cellules ont repoussé dès 72 heures (Mustafa *et al.*, 2013).

Très récemment, une autre souche lentogénique de NDV a été étudiée et semble très prometteuse dans la thérapie du gliome. En effet, la souche Hitchner B1 a été injectée grâce à

un cadre stéréotactique au niveau des gliomes (GL-261) portés par les souris immunocompétentes. Cette souche virale n'entraîne pas d'effets secondaires et permet une augmentation de la survie des souris traitées. Cette efficacité semble due au déclenchement d'une mort cellulaire immunogénique par le NDV, à l'origine du recrutement de lymphocytes T anti-tumoraux. Cette réponse immunitaire apparaît possible à long terme puisque les souris utilisées survivent à une deuxième injection de cellules tumorales : l'existence de lymphocytes mémoires capables de reconnaître les cellules cancéreuses est donc possible (Koks *et al.*, 2015).

Le virus de la maladie de Newcastle a donc un potentiel oncolytique certain. Cependant, seuls quelques cas anecdotiques démontrent d'une efficacité chez l'Homme. De plus, des études précliniques supplémentaires sont indispensables avant d'envisager le NDV comme un candidat de choix dans le traitement des gliomes.

#### **I.2.3.4. Réovirus**

##### **a. Intérêt en tant qu'OV**

Les reovirus (Respiratory Enteric Orphan Virus) sont des virus non enveloppés très peu pathogènes chez l'Homme : ils peuvent être associés à de légers symptômes respiratoires ou gastro-intestinaux, souvent autorésolutifs. Ces virus possèdent un ARN double brin, connu pour être un fort activateur de la Protéine Kinase (PKR). La PKR entraîne alors un arrêt de la synthèse de protéine empêchant alors toute réplication virale. Or cette activation est bloquée pour les cellules tumorales présentant une surexpression de Ras, conférant alors au réovirus une sélectivité envers les cellules tumorales (Coffey *et al.*, 1998). Cette surexpression de Ras étant souvent rencontrée au sein des gliomes (Jeuken *et al.*, 2007), les réovirus sont des candidats intéressants contre ces tumeurs. Cependant cette dépendance à Ras est remise en question depuis quelques années (L Song, 2009).

##### **b. Une innocuité et une efficacité intéressante**

###### *i. Etudes précliniques : un virus prometteur*

Wilcox *et al.* ont été les premiers à tester l'efficacité d'un reovirus sur des cellules de gliomes. Parmi les 24 lignées cellulaires de gliomes testées, 20 étaient sensibles à l'action

lytique d'un réovirus. De plus, 16 cultures primaires de gliomes humains ont été infectées par un réovirus : toutes se sont avérées sensibles au virus. Enfin, *in vivo*, les reovirus sont à l'origine d'une diminution de la taille des gliomes implantés dans le crâne de souris immunodéprimés et permettent une augmentation de la survie de ces souris (Wilcox *et al.*, 2001). Cette cytotoxicité envers les cellules de gliome semble homogène pour tous les sous-types de reovirus (Alloussi *et al.*, 2011).

L'innocuité de ces virus a été confirmée sur des modèles rats et primates non humains. Premièrement, des isogreffes orthotopiques ont été réalisés sur des rats immunocompétents, puis le virus a été injecté à l'aide d'un cadre stéréotactique. L'inoculation n'a pas entraîné d'effets secondaires majeurs et aucun signe d'encéphalite diffuse n'a été mis en évidence. Cette innocuité a été confirmée chez les primates non humains sur lesquels une injection intracrânienne de virus a été réalisée. Hormis une légère hyperthermie, aucun effet secondaire majeur lié au virus n'a été noté (Yang *et al.*, 2004). Enfin, cette étude a permis de confirmer l'efficacité des reovirus : à l'image des résultats obtenus par Wilcox *et al.* sur des souris immunodéprimées, la survie des rats immunocompétents traités est supérieure à celle des rats non traités. Cependant, lors de l'implantation de gliomes dans les deux hémisphères du cerveau des rats, seule la tumeur ipsilatérale traitée présente une régression.

Les études précliniques réalisées sur les reovirus semblent donc attester de leur innocuité et de leur efficacité contre les gliomes. Ceci a permis la réalisation de plusieurs essais cliniques de phase I.

*ii. Essais cliniques : une innocuité et une efficacité limitée*

Alors que plusieurs essais cliniques de phase I avaient déjà été réalisés avec succès pour des tumeurs solides (injection intratumorale ou intraveineuse) (Harrington *et al.*, 2010), il a fallu attendre 2008 pour qu'un essai clinique utilisant les reovirus dans le cadre des gliomes ne soit publié. Dans cette étude, 12 patients ont reçu une seule injection stéréotactique de réovirus. Différentes doses ( $10^7$ - $10^9$  TCID<sub>50</sub> : Tissue Culture Infectious Dose 50) ont été utilisées et la dose maximale tolérée n'a pas été atteinte. Aucun effet secondaire sévère clairement en lien avec le virus n'a été observé, même si des effets secondaires sévères ont été notés. Il est alors difficile d'être certain de l'innocuité du virus. Enfin, le virus n'a pas réellement prouvé son efficacité puisque la maladie a progressé pour 11 des 12 patients (maladie stable pour le 12<sup>ème</sup>).

Un deuxième essai clinique a été publié en 2014 sur 18 patients (Kicielinski *et al.*, 2014). La différence majeure par rapport à l'étude de 2008 réside dans la délivrance du virus. Ici le virus a été administré en CED pendant 72 heures. Aucun effet secondaire sévère lié au virus n'a été noté. De plus une réponse a été observée sur 3 patients qui présentaient alors une maladie stable ou une réponse partielle à la fin de l'étude. La comparaison est cependant difficile avec l'étude précédente puisque les doses de virus utilisées étaient légèrement supérieures ( $10^8$ - $10^{10}$  TCID<sub>50</sub>).

Les reovirus sont donc des virus intéressants dont l'innocuité et l'efficacité peuvent cependant être remis en question à la lumière des différentes études qui ont été réalisées.

### **I.2.3.5. D'autres virus prometteurs dans le traitement des gliomes**

D'autres virus sont actuellement étudiés dans le cadre des gliomes. Des virus humains présentant une sélectivité pour les cellules tumorales ont été atténués afin d'en faire des virus oncolytiques sécuritaires. On peut alors citer le poliovirus, le virus de la stomatite vésiculeuse et le virus de la rougeole dont les essais cliniques de phase I sont déjà programmés. Des virus animaux, a priori peu pathogènes pour l'Homme sont aussi très prometteurs, à l'image du virus de la vaccine ou du virus Sindbis (Wollmann *et al.*, 2012).

Parmi les virus oncolytiques actuellement étudiés, un autre virus se dégage grâce à son innocuité et son efficacité sur des modèles animaux : le virus myxomateux. Dans cette partie, nous allons montrer à quel point ce virus peut être intéressant dans le traitement des gliomes et comment les recherches futures peuvent viser à améliorer son utilisation afin d'en faire un candidat réellement pertinent.

## **I.3. Le virus myxomateux : un Poxvirus particulier**

### **I.3.1 Classification, structure et organisation du virus**

#### **I.3.1.1. Classification au sein des *Poxviridae***

Le virus myxomateux (MYXV) est un virus de la famille de *Poxviridae* au même titre que les virus de la Variole humaine ou bovine (Cowpox) par exemple. Cette famille est divisée

en deux sous-familles : les *Chordopoxvirinae* et les *Entomopoxvirinae* qui infectent respectivement les vertébrés et les invertébrés.

Au sein des *Chordopoxvirinae* on distingue 10 genres dont les plus importants sont le genre des *Orthopoxviridae* comprenant les virus de la variole et le virus de la vaccine ou VACV (virus prototype des *Poxviridae*) ainsi que celui *Leporipoxviridae* auquel appartient le MYXV (Tableau 7).

Sous-famille	Genre	Espèce	Hôte naturel
<i>Entomopoxvirinae</i>	<i>Alphaentomopoxvirus</i>	Melolontha entomopoxvirus	Scarabée
	<i>Betaentomopoxvirus</i>	Amscata moorei entomopoxvirus	Papillon, sauterelle, phalène
	<i>Gamaentomopoxvirus</i>	Chironomus luridus entomopoxvirus	Mouches et moustiques
<i>Chordopoxvirinae</i>	<i>Avipoxvirus</i>	Canarypoxvirus	Oiseaux
		Virus de la variole de la caille	Caille
		Virus de la variole du pigeon	Pigeon
		Virus de la cariole du canari	Canari
		Virus de la variole du dindon	Dindon
		Virus de la variole aviaire	Oiseau
	<i>Capri poxvirus</i>	Virus de la variole caprine	Chèvre
		Virus de la clavelée	Mouton
		Lumpy skin disease virus	Bovins
	<i>Cervidpoxvirus</i>	Deer Poxvirus	Cervidés
	<i>Crocodylidpoxvirus</i>	Nile crocodilepox virus	Crocodiles
	<i>Leporipoxvirus</i>	Virus du fibrome de Shope	Lapins
		Virus du fibrome du lièvre	Lièvre
		Virus du fibrome de l'écureuil	Eccureuil
Myxoma virus		Lapins	

<i>Molluscipoxvirus</i>	Virus du Molluscum contagium	Homme
<i>Orthopoxvirus</i>	Virus de la variole du chameau	Chameau
	Cowpox virus	Bovins
	Ectromela virus	Rongeurs
	Virus de la variole équine	Chevaux
	Virus de la variole du singe	Singe
	Virus de la variole humaine	Homme
	Virus de la Vaccine	Homme
<i>Parapoxvirus</i>	Virus de l'écthyma contagieux	Bovins
	Virus de la stomatite papuleuse	Bovins
	Pseudocowpox	
	Orf virus	Mouton
<i>Suipoxvirus</i>	Virus de la variole porcine	Porcs
<i>Yatapoxvirus</i>	Tanapox virus	Homme/Rongeurs
	Virus de la tumeur Yaba du singe	Singes
	Melanoplus sanguinipes	Insectes

Tableau 7: Classification de la famille des *Poxviridae* (source ICTV)

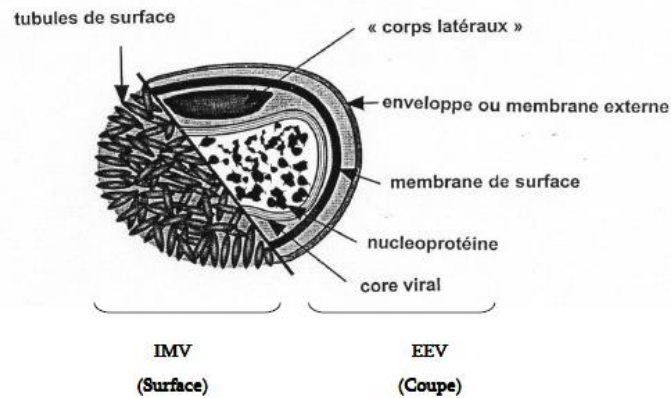
### I.3.1.2. Structure des virions

En tant que membre de la famille des *Poxviridae*, le MYXV répond aux critères de cette famille. Le VACV étant le plus étudié, nous allons nous appuyer sur ce virus afin de décrire la structure du MYXV.

Les poxvirus font partie des plus gros et des plus complexes virus connus. Ils mesurent de 200 à 400 nm et ont une forme ovoïde. On différencie 4 structures : le core, les corps latéraux, la membrane et la/les enveloppes(s) (Fig.10).

Le core est une coque interne épaisse dans laquelle on trouve le génome viral (ADN linéaire double brin) et les protéines virales indispensables aux premières étapes de la

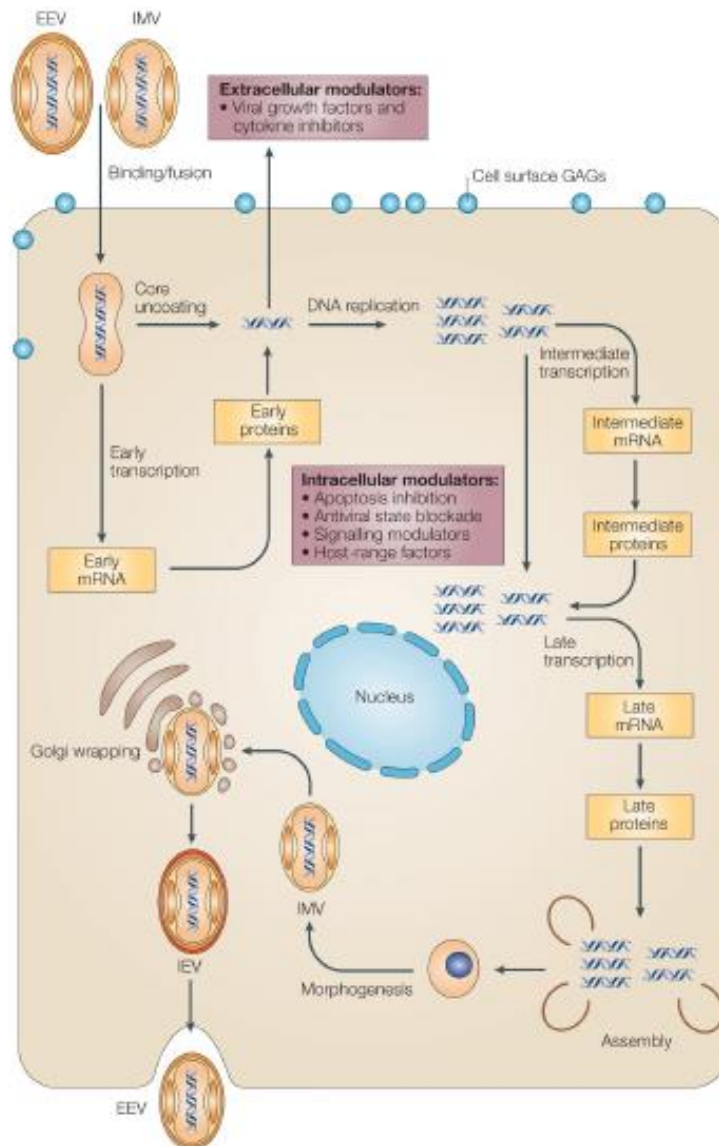
réplication. Les corps latéraux sont des structures lenticulaires situées dans les concavités du core. La paroi, qui entoure le core, est une bicouche protéique de 5 nm d'épaisseur (Top, 2012).



**Figure 10:** Représentation schématique d'un Orthopoxviridae (d'après Van Regenmorel *et al.*, 2000)

Selon la nature et le nombre d'enveloppes virales, on distingue plusieurs formes virales : les Mature Virus ou IMV (Virions Intracellulaires Matures), les Wrapped Virus ou IEV (Virions Intracellulaire Enveloppés) et les Extracellular Virus comprenant les EEV (Virions Extracellulaires Enveloppés) et les CEV (Virus Enveloppés associées à la membrane de la Cellule) (Condit *et al.*, 2006; Moss, 2006). Les IMV (ou MV), EEV et CEV (regroupées sous le terme EV) représentent les formes infectieuses, contrairement aux IEV.

Les MV sont la forme cytoplasmique du virus et ne seront libérés qu'à la lyse de la cellule hôte. Cette forme virale, qui constitue la majorité de la progénie virale, va alors s'entourer d'une double enveloppe supplémentaire (issue du Golgi et des endosomes) *et alors* constituer un IEV/MV. Les IEV/MV vont alors migrer vers la membrane plasmique, fusionner avec elle et être libérés par exocytose : ce sont alors des EV. Le CEV sont une partie des EV, retenus par la membrane cellulaire (McFadden, 2005) (Fig.11).



**Figure 11:** Représentation schématique des différentes formes virales de *Poxviridae* (Mac Fadden *et al.*, 2005)

### I.3.1.3. Organisation du génome

Le génome des *Poxviridae* est formé d'un ADN linéaire bicaténaire dont les extrémités sont liées de façon covalente par des boucles terminales en épingle à cheveux. La taille de l'ADN des poxvirus varie entre 130 et 375 kpb, celui du MYXV mesure 162 kpb (171 gènes) (Fig.12).

Le génome s'organise en une région centrale contenant des gènes hautement conservés (enzymes, protéines structurales) et des séquences terminales inversées répétées (TIR) de 10-



15 kpb codant pour des gènes non essentiels (facteurs de pathogénicité qui seront détaillés ci-après).

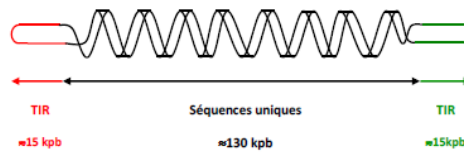


Figure 12: Organisation générale du génome des *Poxviridae*

### I.3.2 Cycle viral

A l'image de l'organisation du génome, le cycle viral du MYXV est similaire à celui des autres poxvirus comme le VACV sur lequel nous nous appuyerons ici (Fig.11).

Le cycle des poxvirus est entièrement intracytoplasmique évoquant alors une autonomie pour la réplication et la transcription. Le cycle du MYXV dure 16 heures (Duteyrat *et al.*, 2006), soit une durée équivalente au VACV pour lequel il dure 12-24 heures (Moss, 2006).

#### I.3.2.1. Entrée dans la cellule

Les mécanismes d'entrée des poxvirus dans la cellule hôte ne sont pas clairement établis et plusieurs hypothèses sont aujourd'hui soulevées en fonction de la forme virale concernée.

Tout d'abord une interaction entre les protéines virales et les glycosaminoglycanes de la membrane cellulaire serait la première étape de l'entrée du virus. Cependant, leur présence ne semble pas indispensable à l'infection (Top, 2012).

Pour les IMV, plusieurs hypothèses sont avancées quant à l'entrée du virus. La plus communément admise évoque une fusion entre la membrane des IMV et la membrane cellulaire. Certains auteurs pensent que les IMV perdent leur enveloppe avant d'entrer dans la cellule, le core rentrant ainsi seul dans le cytoplasme. La troisième hypothèse suggère une endocytose des IMV (Townsend *et al.*, 2006). Cette hypothèse semble être confirmée par (Duteyrat *et al.*, 2006) pour le MYXV. Dans le cadre du VACV, l'étude de virus mutant pour certains gènes a permis de mettre en évidence un complexe de 8 protéines (A16, A21, A28, G3, G9, H2, J5 et L5) qui seraient impliquées dans l'entrée du virus dans la cellule hôte (Senkevich *et al.*, 2005). Les gènes, codant ces protéines (sauf G3), sont conservés au sein des *Poxviridae* et pourraient donc être impliqués dans l'entrée du MYXV.

Les mécanismes d'entrée des EEV dans la cellule sont difficiles à déterminer à cause de leur faible nombre et de leur fragilité. D'après Law *et al.*, il semblerait que leur membrane soit rompue à l'extérieur de la cellule, avant l'entrée des IMV par un des mécanismes présentés précédemment (Law *et al.*, 2006).

### **I.3.2.2. Réplication et formation des virions**

L'expression des gènes se déroule de façon séquentielle au cours du cycle, chaque évènement contrôlant le suivant: les gènes précoces codent essentiellement pour les protéines de la réplication virale et de l'échappement au SI, tandis que les gènes tardifs codent pour des protéines structurales (core, enveloppes). La régulation de l'expression se fait grâce à la présence de promoteurs activés au fur et à mesure du cycle viral: l'ADN des poxvirus est donc un cadre ouvert de lecture permanent (Blanie, 2009).

#### **a. Expression des gènes précoces**

Dès l'entrée du virus dans la cellule, et avant même sa décapsidation, les premiers ARNm sont transcrits grâce à l'ARN-polymérase déjà présente au sein du core. Ces premiers ARNm permettent la synthèse de protéines impliquées dans la réplication de l'ADN, la biosynthèse des nucléotides, la transcription des gènes intermédiaires mais aussi certains mécanismes d'échappement au SI. De plus, la transcription des ARN ainsi que la synthèse des protéines précoces permet la décapsidation et la libération du génome. Cette décapsidation menant elle-même à l'arrêt de la transcription des gènes précoces ainsi que la réplication du génome viral (Knipe and Howley, 2007).

#### **b. Réplication du génome viral**

Le génome du virus se réplique de façon autonome dans le cytoplasme de la cellule infectée grâce aux enzymes synthétisées en phase précoce. L'ADN viral ne s'associe aux membranes du réticulum endoplasmique (RE) qui l'enveloppent pour former un compartiment dans lequel la réplication s'initie : ce compartiment est appelé un virosome.

Il semble que l'initiation et la terminaison de la réplication aient lieu dans les télomères viraux (séquences d'ADN non codantes situées aux extrémités l'ADN viral) puisqu'à un stade

précoce du cycle, la boucle présente dans chaque télomère est rompue par une endonucléase spécifique présente dans le core viral (DeLange and McFadden, 1990).

### **c. Expression des gènes intermédiaires et tardifs**

L'ADN initial semble inaccessible aux facteurs de transcription des gènes intermédiaires et tardifs : c'est donc pour cela que la réplication est indispensable à la transcription de ces gènes.

Tandis que les gènes intermédiaires sont à l'origine de protéines impliquées dans la régulation des gènes tardifs, ces derniers codent pour les facteurs de transcription des gènes précoces, ainsi que pour les protéines participant à la morphogénèse et l'assemblage des virions néoformés (Blanie, 2009).

### **d. Assemblage du virion**

L'assemblage du virion se poursuit au sein du virosome. Les premières membranes en forme de croissant sont formées de lipides et de protéines virales. Elles s'assemblent alors pour former des virions immatures (IV). L'origine de ces membranes n'est pas clairement établie. Une formation *de novo* a été évoquée, mais par la suite certains auteurs ont souligné la possibilité d'une origine cellulaire (appareil de Golgi, RE). Puis, les IV s'arrondissent et deviennent matures par clivage protéolytique des protéines de capsid et par condensation du core viral : les IMV, les premières formes infectieuses des virions, sont alors produits. Pour la majorité des virions, la morphogénèse s'arrête là, ces IMV seront alors libérés lors de la lyse cellulaire.

Certains IMV migrent vers les endosomes ou le Golgi, via le système microtubulaire intracellulaire, et sont enveloppés d'une double membrane, pour devenir les IEV. Les IEV migrent, ensuite vers la périphérie de la cellule où leur enveloppe externe fusionne avec la membrane plasmique : un virion enveloppé est alors exposé à la surface de la cellule, c'est le CEV.

Des protéines virales sont alors à l'origine d'une polymérisation des fibres d'actine qui permet le passage des CEV vers les cellules voisines. Ceci est particulièrement important pour des cellules cultivées en monocouches puisque les CEV permettent la dissémination du virus de proche en proche. Chez le MYXV, des ponts cytoplasmiques permettant cette diffusion ont aussi été observés par microscopie électronique (Duteyrat *et al.*, 2006). Une partie des CEV est aussi libérée dans le milieu pour former des EEV qui vont disséminer à distance. La progression

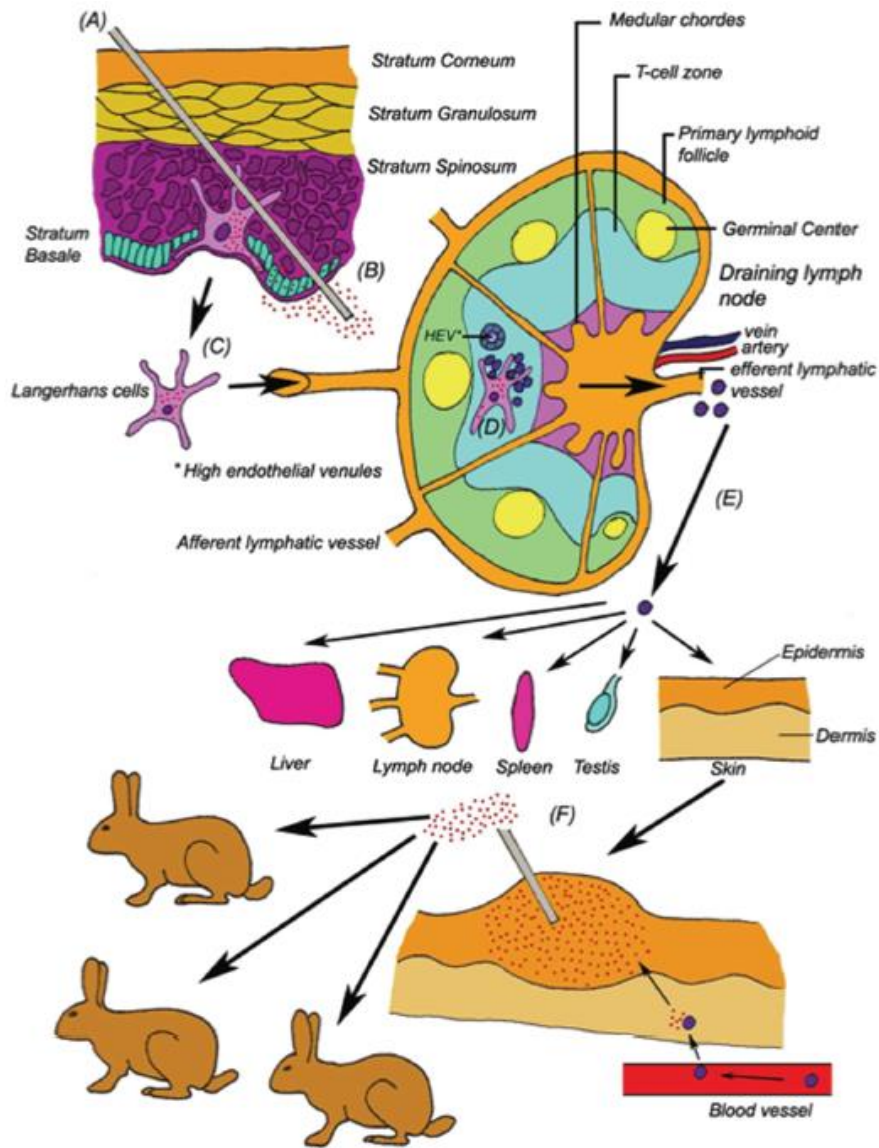
virale peut aussi se faire pas fusion cellulaire et formation de syncytium (Knipe and Howley, 2007).

### **I.3.3 Pathogénicité**

#### **I.3.3.1. Un virus responsable de la myxomatose**

La myxomatose est une maladie qui touche essentiellement le lapin et notamment le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*). Selon la souche et l'espèce de lapin touchée, la virulence du virus peut être différente (Stanford *et al.*, 2007a). Cette maladie été décrite pour la première fois en 1896 en Uruguay comme une maladie mortelle, caractérisée par l'apparition de nodules appelés myxomes. La maladie fut ensuite appelée myxomatose du grec *muxa*, mucus et *oma*, tumeur (Fenner and Chapple, 1965). Apparue en Amérique du Sud, le MYXV a ensuite été importé en Australie afin de décimer des populations de lapins devenus nuisibles, puis en Europe. Quatre-vingt-quinze pourcent de la population de lapin a été décimé mais certains individus ont développé des infections non létales grâce à une moindre sensibilité intrinsèque ou à des souches virales moins virulentes. Ce sont donc ces lapins qui ont ensuite été à l'origine de l'expansion du virus à l'échelle mondiale à cause, notamment, des échanges entre les pays (Spiesschaert *et al.*, 2011).

Le MYXV est transmis au lapin, principalement par l'intermédiaire d'un arthropode vecteur. Il va ensuite infecter essentiellement les cellules dendritiques exprimant le CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) II du derme de l'animal avant d'atteindre le nœud lymphatique drainant la zone d'inoculation. Le MYXV va ensuite infecter les lymphocytes T et les macrophages avant de se répartir dans tout l'organisme (peau, rein, poumon, foie, rate). Une immunodépression majeure se met donc en place rapidement. Il faut cependant attendre 2 à 5 jours avant d'observer les premières lésions cutanées œdémateuses (ou myxomes) au point d'inoculation qui vont ensuite s'étendre à l'ensemble du corps de l'animal infecté (Fig.13). Pour les formes les plus graves, le virus est généralement léthal en 10 à 14 jours (Spiesschaert *et al.*, 2011). De façon plus anecdotique, il existe aussi une forme majoritairement respiratoire de myxomatose où les lésions cutanées sont rares (Marlier *et al.*, 1999).



**Figure 13:** Pathogenèse du MYXV (d'après Spiesschaert *et al.*, 2011)

Après une infection à point de départ cutané, le MYXV se multiplie dans les nœuds lymphatiques des lapins atteints avant de s'étendre dans l'ensemble de l'organisme donc la peau où il est responsable des myxomes caractéristiques de la maladie.

### I.3.3.2. Des facteurs de pathogénicité variés

Plusieurs protéines virales sont à l'origine de la pathogénie du MYXV et peuvent être divisées en fonction de leur rôle. Ces facteurs sont résumés dans le Tableau 8.

### **a. Inhibition de l'apoptose**

L'apoptose est un mécanisme antiviral majeur puisqu'elle empêche la réalisation du cycle viral en engageant la cellule dans un processus de mort programmée (Blanie, 2009). Empêcher sa réalisation confère alors au virus un avantage fondamental.

#### **M-T2**

M-T2 était d'abord considérée comme un homologue du récepteur au Tumor Necrosis Factor Alpha (TNFR) empêchant donc son action (Schreiber *et al.*, 1997). Le TNF $\alpha$  permet de stimuler la réponse immunitaire, d'activer l'apoptose cellulaire et de détruire le virus au sein des cellules : inhiber son action est donc un avantage certain à l'extension du MYXV (Spiesschaert *et al.*, 2011). La protéine M-T2 existe en réalité sous 2 formes : une forme extracellulaire qui inhibe l'action du TNF $\alpha$  (homologue du TNFR) et une forme intracellulaire qui inhibe la cascade de signalisation démarrante à partir de l'activation du TNFR (Sedger *et al.*, 2006).

#### **M-T4**

M-T4 est une protéine virale localisée au niveau du RE qui est capable d'inhiber l'apoptose des cellules infectées grâce à son interaction avec la protéine Bap31. De plus, M-T4 semble diminuer la réponse immunitaire puisque les virus mutants KO (Knock Out) pour M-T4 entraînent une sur-stimulation inflammatoire (Hnatiuk *et al.*, 1999).

#### **M-T5**

M-T5 est une protéine présentant un motif ankyrine répété. Il semblerait que cette protéine empêche l'arrêt de la synthèse protéique dans la cellule infectée évitant de ce fait son apoptose. Cette protéine permet aussi l'infection des lymphocytes et donc l'extension dans tout l'organisme du lapin atteint. De plus cette protéine interagit avec Akt, une protéine impliquée dans la survie et la prolifération cellulaire (Werden and McFadden, 2008). M-T5 joue aussi un rôle dans la régulation du cycle cellulaire, elle permet la progression du cycle cellulaire du stade G0/G1 au stade G2/M (Johnston *et al.*, 2005a).

## **M11L**

M11L se localise au niveau de la membrane externe des mitochondries où elle interagit avec le récepteur aux benzodiazépines, pour contrer l'apoptose cellulaire. De plus, M011L forme également un complexe avec la protéine Bak (famille des Bcl-2), pour inhiber l'activation de la protéine pro-apoptotique Bax (Douglas *et al.*, 2007).

## **SERP2**

SERP2 appartient à la famille des serpines (SERine Protéases INhibitor), qui inhibent de façon irréversible les sérines protéases. Le gène M151R code pour cette protéine qui est capable d'inhiber l'apoptosome et le clivage des caspases par les granzymes. Cette propriété permet alors d'inhiber l'apoptose (Messud-Petit *et al.*, 1998).

### **b. Inhibition de la réponse aux interférons**

## **M-T7**

Cette protéine est un virorécepteur, c'est-à-dire un groupe de protéines virales agissant comme un récepteur leurre qui se fixe aux cytokines, chémokines et facteurs de croissance de l'hôte afin d'empêcher leur action.

La protéine M-T7 est un homologue du récepteur à l'IFN $\gamma$ . Les IFN se divisent en 2 types : les IFN de type I ( $\alpha$  et  $\beta$ ) et les IFN de type II ( $\gamma$ ). Alors que les IFN de type I sont sécrétés par la plupart des cellules de l'organisme, les IFN de type II sont sécrétés majoritairement par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> après leur interaction avec les cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques. Les IFN entraînent une cascade de signalisation menant au développement d'un état antiviral par la cellule.

La protéine M-T7 est sécrétée par la cellule infectée, se lie à l'IFN $\gamma$  et empêche son action par inhibition compétitive conférant alors au virus une défense contre le SI de l'organisme hôte. M-T7 serait aussi impliquée dans l'inhibition de l'action d'autres chémokines (C, CC, CXC) par l'intermédiaire des domaines de fixation de l'héparine (Bartee *et al.*, 2014; Lalani *et al.*, 1997). Ce mécanisme est alors à l'origine des propriétés anti-inflammatoires de M-T7. Cette fixation aux différentes chémokines ne semble pas spécifique d'espèce à la différence de la fixation avec l'IFN $\gamma$  puisque M-T7 est incapable de se fixer à l'IFN $\gamma$  murin et humain (Bartee *et al.*, 2014).

## **M029**

M029 est une protéine indispensable à la réplication du MYXV au sein de sa cellule hôte et serait donc déterminante dans le spectre d'hôte du virus.

Par l'intermédiaire d'un ARN viral double brin, cette protéine est capable de se fixer à la PKR et d'ainsi inhiber son action antivirale. La PKR, comme précédemment mentionnée, est une protéine activée par la présence d'ARN viral double brin et par les IFN. De plus, M029 se lie au complexe DHX9/RHA situé en aval dans la voie de signalisation de la PKR. Ce complexe protéique semble détenir une action pro-virale puisque les cellules qui en sont dépourvues ne permettent pas une réplication efficace du MYXV (Rahman *et al.*, 2013).

## **M135R**

Cette protéine possède des fortes ressemblances structurales avec la protéine B18R du VACV, connue pour imiter les récepteurs aux IFN de type I et donc inhiber leurs actions. Barrett *et al.* ont tenté de comprendre en quoi cette protéine était importante pour le MYXV. A l'aide de mutant KO pour cette protéine, ils ont montré qu'elle n'était pas indispensable pour la réplication *in vitro*, mais que son absence atténuait grandement la maladie *in vivo*. Cependant, il semble que M135R ne se fixe pas aux IFN de type I. Le mécanisme d'action de cette protéine n'est donc pas encore connu bien que son importance soit, quant à elle, confirmée (Barrett *et al.*, 2007a).

### **c. Inhibition de la réponse immunitaire**

## **M-T1**

M-T1 est une glycoprotéine sécrétée qui se lie aux chémokines CC, inhibant ainsi la chimiotactisme des leucocytes (Seet *et al.*, 2001).

## **SERP-1**

Serp-1 est une serpine sécrétée capable d'inhiber des sérines protéases humaines telles que la plasmine, l'urokinase ou l'activateur de plasminogène. Cependant, le rôle de SERP-1 dans la virulence du MYXV n'est pas clairement établi (Wang *et al.*, 2000). L'inoculation de MYXV délétés de Serp-1 à des lapins se traduit par une augmentation des infiltrats de cellules mononuclées et une réponse inflammatoire plus prononcée au site d'inoculation (Macen *et al.*, 1993) évoquant un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire.



### **SERP-3**

Serp-3 est la troisième serpine codée par le MYXV. Même si cette protéine n'est pas indispensable à la multiplication du virus *in vivo*, il semble qu'elle soit un facteur de virulence important. En effet, l'inoculation de MYXV délété de Serp-3 à des lapins se traduit par une augmentation de la réponse inflammatoire au site d'inoculation et une absence de myxomes secondaires au niveau des nœuds lymphatiques, conduisant à une forte atténuation du pouvoir pathogène (Guerin *et al.*, 2001).

### **M029L**

M029L appartient à la famille des protéines à domaine PYRIN. Cette protéine est capable d'inhiber l'activation de la caspase-1 et des IL-1 $\beta$  et 18 au sein de l'inflammasome (Johnston *et al.*, 2005b). De plus, grâce à l'utilisation du virus KO pour M029L, Rahman *et al.* ont montré que cette protéine était capable d'inhiber la translocation nucléaire du facteur de transcription NF $\kappa$ B. Or, NF $\kappa$ B permet la transcription de nombreuses cytokines inflammatoires telles que le TNF $\alpha$ , l'interleukine 6 ou MCP-1 dont la sécrétion est diminuée par l'action de M029L. Les propriétés de M029L lui confèrent donc une activité anti-inflammatoire cruciale à la multiplication du MYXV *in vivo* (Rahman *et al.*, 2009).

### **M128L**

M128L est une protéine associée aux membranes, homologue au CD47 cellulaire impliqué dans la régulation de la réponse immunitaire, notamment par son implication dans l'activation cellulaire, la modulation de l'adhésion, la mobilité et la phagocytose des leucocytes. En 2005, Cameron *et al.* ont montré que l'infection de lapins par un MYXV délété de M128L se caractérisait par une augmentation du nombre de cellules monocytes et macrophages activés au site d'infection et dans les tissus lymphoïdes. Ceci semble associé à une diminution de la virulence du virus 7 jours après infection confirmant alors le rôle important de la protéine M128L dans la pathogénicité du MYXV (Cameron *et al.*, 2005a).

### **M141R**

M141R est un homologue structural de la protéine CD200 qui est exprimée à la surface de nombreuses cellules du SI. Le CD200 agit comme un ligand de son récepteur CD200R qui n'est exprimé qu'à la surface des cellules myéloïdes. Le complexe CD200-CD200R aurait un rôle inhibiteur sur ces cellules. M141R serait alors capable d'exercer une action similaire sur les cellules dendritiques et les macrophages en limitant la présentation d'antigènes aux

lymphocytes T. En effet, l'infection par un MYXV délété du gène M141R entraîne une augmentation de l'activation des macrophages et des lymphocytes (Cameron *et al.*, 2005b).

### **MNF (Myxoma Nuclear Factor)**

A l'image de nombreux autres facteurs de virulence, la délétion du gène codant pour la protéine MNF (gène M150R) diminue grandement les symptômes des lapins infectés, évoquant alors le rôle primordial de la protéine dans la pathogénicité du MYXV (Camus-Bouclainville *et al.*, 2004). Cette protéine semble inhiber l'action du facteur de transcription NFκB qui est activé par des signaux pro-inflammatoires afin de stimuler la réponse cellulaire antivirale. MNF possède plusieurs répétitions du motif ankyrine. Cette propriété semble associée à sa capacité de liaison au complexe SCF (Skp, Culline, F-box), un complexe d'ubiquitine ligase à l'origine de la dégradation de plusieurs protéines cellulaires. Cependant, aucun lien entre la liaison à ce complexe et NFκB n'a encore été objectivé (Blanié *et al.*, 2010).

### **MV-LAP**

MV-LAP codée par le gène M153R appartient à la famille des scrapines (Surface Cell Receptor Abductor Protein). Elle possède un domaine LAP (Leukemia Associated Protein) auquel est associée une fonction d'ubiquitine ligase. Elle permet ainsi la dérégulation des molécules de surfaces telles que le CMH-I, CD95 (Guerin *et al.*, 2002) et CD4 (Mansouri *et al.*, 2003) en les ubiquitinant, entraînant ainsi leur dégradation par le protéasome (Collin *et al.*, 2005). Les molécules du CMH-I permettent la présentation de peptides dérivés de protéines cytosoliques à la surface des cellules infectées (peptides du soi et issus d'antigènes viraux). Le peptide couplé au CMH-I en interagissant avec le récepteur TCR (T Cell Receptor) des lymphocytes T CD8, induit leur multiplication clonale. MV-LAP permet donc d'inhiber la réponse immunitaire.

## **d. Activation du cycle cellulaire**

### **M10L**

M10L appartient à la famille des virokines. Les virokines sont des protéines sécrétées qui imitent les cytokines et facteurs de croissance de l'hôte. La protéine M10L est un homologue fonctionnel de l'EGF du lapin qui, avec la protéine virale M131R, active des

signaux mitogéniques responsables des lésions pseudotumorales (myxomes) observées sur la peau des lagomorphes (Opgenorth *et al.*, 1992)

#### **e. Facteurs d'hôte**

Deux protéines virales sont considérées comme des facteurs d'hôte (M062, M063) : autrement dit, la présence de ces protéines est indispensable à la multiplication du MYXV au sein des cellules de lapins (Adams *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2011). De plus, M062 semble impliquée dans la capacité du MYXV à se répliquer au sein des cellules tumorales comme nous allons le voir ci-après. La protéine M064 est très similaire aux deux autres précédemment citées mais aucune étude n'a, pour le moment, démontré son rôle en tant que facteur d'hôte. Cependant, M064 est un facteur de virulence important puisque sans cette protéine, les symptômes de myxomatose sont très limités (Liu *et al.*, 2012).

#### **f. Bilan facteurs de virulence**

L'étude d'homologie au sein de la famille des *Poxviridae* ainsi que l'utilisation de virus délétés ont donc permis de mettre en évidence de nombreux facteurs de virulence avec des rôles variés (Tableau 8). Parmi ces multiples rôles on trouve (i) l'inhibition de l'apoptose (ii) l'inhibition de l'activation de la PKR (iii) l'inhibition du chimiotactisme et de l'activation des lymphocytes (iv) l'activation de la mitose dans la cellule (v) l'inhibition de la réponse aux IFN. Ces facteurs de virulence seraient majoritairement spécifiques aux lagomorphes, prévenant ainsi le développement de la maladie chez les autres espèces capables de se défendre efficacement contre le virus.

Ces facteurs de virulence sont indispensables pour infecter des cellules normales capables de se défendre efficacement contre un virus. A l'inverse d'une cellule normale, une cellule tumorale présente une immunité antivirale défectueuse. C'est pourquoi, entre autre, que le MYXV peut être intéressant en virothérapie oncolytique comme le montrent les différentes études présentées ci-après.

Rôle	Protéine	Gène	Fonctions/propriétés	Références
Inhibition de l'apoptose	M-T2	M002L/R	Homologue du récepteur au TNF $\alpha$ , Inhibition cascade TNFR, Empêche l'apoptose des lymphocytes	Sedger <i>et al.</i> , 2006
	M-T4	M004L/R	Interaction possible avec complexe BAP31, situé dans ER	Hnatiuk <i>et al.</i> , 1999
	M-T5	M005L/R	Interaction avec Akt, cycle cellulaire, extension dans l'organisme, facteur d'hôte	Werden <i>et al.</i> , 2008, Johnston <i>et al.</i> , 2005
	M11L	M011L	Inhibition de l'action de Bax	Douglas <i>et al.</i> , 2007
	SERP-2	M151R	Inhibiteur des protéases intracellulaires	Messud-Petit <i>et al.</i> , 1998
Contrôle de la réponse aux IFN	M-T7	M007L/R	Homologie au récepteur aux IFN $\gamma$ , activité anti-inflammatoire	Bartee <i>et al.</i> , 2014; Lalani <i>et al.</i> , 1997
	M029L	M029L	Inhibition de la PKR, interaction avec DHX9/RHA	Rahman <i>et al.</i> , 2013
	M135R	M135R	Analogie avec B18R, pas d'interaction apparente avec les IFN de type I	Barrett <i>et al.</i> , 2000
	M156R	M156R	Homologie au facteur eIF2 $\alpha$ , inhibition de la voie PKR possible	Ramelot <i>et al.</i> 2002
Inhibition de la réponse inflammatoire	M-T1	M001L/R	Liaison avec les chémokines CC, inhibition du chimiotactisme	Seet <i>et al.</i> , 2001
	SERP-1	M008.1L/R	Inhibiteur de sérine protéases, activité anti-inflammatoire	Macen <i>et al.</i> , 1993
	M13L	M013L	Inhibiteur de NF-kappaB, de l'inflammasome (caspase 1, IL1 $\beta$ , IL-18)	Rahman <i>et al.</i> , 2009
	M128L	M128L	Homologue du CD47, Immunomodulation	Cameron <i>et al.</i> , 2005
	M141R	M141R	Homologue du CD200, Inhibition de l'activation des macrophages et des LT	Cameron <i>et al.</i> , 2005b
	SERP-3	M152-R	Rôle dans la virulence du virus	Guérin <i>et al.</i> , 2001
	MNF	M150-R	Interaction avec NF $\kappa$ B, liaison au complexe SCF	Camus <i>et al.</i> 2004, Blanié <i>et al.</i> , 2010

	MV-LAP	M153R	Scrapine, diminution du CMH-I, CD4, Fas-CD95	Guérin <i>et al.</i> , 2003
Contrôle du cycle cellulaire	MGF	M010L	Homologue de l'EGF	Opgenorth <i>et al.</i> , 1993
Facteurs d'hôte	M062	M062R	Nécessaire pour la réplication dans les cellules de lapin et les cellules humains cancéreuses, se lie à SAMD9	Liu <i>et al.</i> , 2011
	M063	M063R	Nécessaire pour la réplication dans les cellules de lapins	Adams <i>et al.</i> , 2008
	M064	M064R	Apparentée à M062 et M063 mais pas un facteur d'hôte <i>in vitro</i>	Liu <i>et al.</i> , 20112

Tableau 8: Facteurs de virulence du MYXV

## I.4. Intérêt du virus myxomateux dans le traitement des gliomes

Afin d'envisager son utilité en tant qu'agent thérapeutique, la qualité principale d'un VO est son innocuité comme nous l'avons montré précédemment.

### I.4.1 Le MYXV est sélectif et inoffensif

#### I.4.1.1. Le MYXV est très spécifique des lagomorphes

En 1950 en Australie, MYXV a été utilisé afin de décimer une population de lapins considérée comme nuisibles : en 1 an, 99% des lapins de la zone d'introduction furent tués. Pendant cette année, aucune séroconversion sur un autre vertébré n'a été rapporté. Ceci tend à prouver la spécificité d'hôte très étroite du MYXV (Chan *et al.*, 2013a).

En 2004, Wang *et al.* (Wang *et al.*, 2004) ont étudié le mécanisme responsable de cette barrière d'espèce. Grâce à l'utilisation de fibroblastes embryonnaires de souris, ils ont démontré que la voie de signalisation de Erk1/2 (impliqué dans la réponse aux IFN) était responsable de la spécificité d'hôte. En effet, les cellules non permissives sont capables de produire des interférons de type I dont l'effet antiviral est médié par la protéine STAT1 (Signal Transducer and Activation of Transcription). Ces éléments épidémiologiques et mécanistiques montrent

donc que le MYXV semble inoffensif et peut donc être utilisé en tant qu'agent thérapeutique chez l'Homme et l'animal.

#### **I.4.1.2. Le MYXV est sélectif envers les cellules tumorales**

En 2004, Sypula *et al.* ont conclu que le MYXV était capable d'infecter et de lyser diverses cellules cancéreuses humaines comme les cellules de mélanomes, d'ostéosarcomes, de cancers de la prostate, de carcinomes rénaux pulmonaires et ovariens. Cependant, une question restait en suspens : pourquoi le MYXV est-il sélectif pour les cellules tumorales ?

Wang *et al.* montrèrent que la permissivité était étroitement liée à la quantité de la protéine Akt phosphorylée (p-Akt) (Wang *et al.*, 2006). En effet, ils identifièrent 3 types de cellules : (i) type I, des cellules très permissives au MYXV avec un haut niveau de p-Akt (ii) type II, des cellules définies comme « restrictives » (permissive au virus sauvage mais pas au virus mutant délété du gène codant pour la protéine M-T5), avec un niveau intermédiaire de p-Akt et (iii) type III, ces cellules non permissives avec peu voire pas de p-Akt. Cette conclusion fut confirmée par la diminution de la réplication du MYXV suite à l'inactivation d'Akt et l'augmentation de la réplication permise par l'expression d'Akt constitutivement phosphorylée. C'est la protéine M-T5 qui semble être à l'origine de cette dépendance entre la réplication du MYXV et p-Akt (Wang *et al.*, 2006) (Fig.14).

Les gliomes sont parmi les tumeurs qui présentent des hauts niveaux de p-Akt. En effet, l'activation d'EGFR ou du PDGFR $\beta$ , à l'origine de la phosphorylation d'Akt, est un des mécanismes impliqué dans la tumorigénèse des gliomes (Verhaak *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2015).

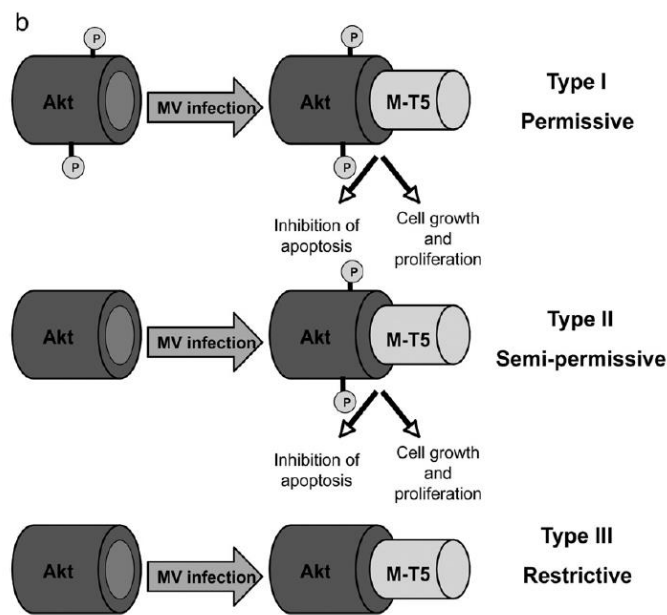


Figure 14: Lien entre la permissivité des cellules et le niveau de phosphorylation d'Akt (issu de Werden et al., 2008)

#### I.4.1.3. L'injection intracrânienne du MYXV est inoffensive pour les cellules cérébrales normales

Dans le cadre du gliome, l'injection intracrânienne (i.c) est la plus appropriée. En effet, la tumeur est localisée au niveau du système nerveux central et ne métastase pas. De plus, l'injection intra-tumorale (i.t) est celle qui permet d'atteindre une concentration virale maximale en minimisant les effets secondaires, par rapport à une injection intraveineuse (IV) où le virus serait « dilué » dans le volume sanguin, détruit par le SI et responsable d'effets secondaires supérieurs. Plusieurs études ont montré l'innocuité de l'injection i.c de MYXV chez des rongeurs immunodéprimés et immunocompétents (Josiah *et al.*, 2010; Lun *et al.*, 2005, 2010; Ogbomo *et al.*, 2013; Zemp *et al.*, 2013a, 2013b). En effet, de fortes doses de MYXV injecté à l'aide d'un cadre stéréotaxique dans le cerveau de rats n'a induit qu'une inflammation minime sans aucun signe clinique ou radiologique de méningo-encéphalite diffuse (Lun *et al.*, 2005). Dans une autre étude, une légère perte de poids ainsi qu'une légère inflammation cérébrale étaient les seuls effets secondaires observés 2 semaines après l'injection i.c du MYXV (Lun *et al.*, 2010).

De plus, l'injection au niveau des ventricules cérébraux semblent inoffensive. Après l'injection du MYXV dans le ventricule latéral droit de souris C57BL/6, des analyses

immunohistochimiques des tissus environnant ont montré une très bonne résistance à l'infection. Quelques rares cellules épendymaires et subventriculaires étaient infectées et la plupart d'entre elles restaient viables. Les souris injectées n'ont ainsi pas présenté de signes neurologiques (France *et al.*, 2011).

Autant d'études qui confirment l'innocuité du MYXV qui serait alors un agent thérapeutique sécuritaire dans le traitement des tumeurs intracérébrales comme les gliomes.

#### **I.4.1.4. Le MYXV est capable d'infecter et de détruire sélectivement diverses lignées cellulaires de gliomes**

Plusieurs auteurs rapportent que le MYXV est capable d'infecter et de détruire plusieurs lignées cellulaires de gliomes. Afin de démontrer ceci, des lignées cellulaires, cultivées en monocouches, ont été infectées lorsqu'elles étaient à quasi-confluence ou confluence complète. Par la suite, la permissivité des cellules et la viabilité cellulaire post-infection ont été mesurées par différentes méthodes qui varient selon les auteurs (Lun *et al.*, 2005; Ogbomo *et al.*, 2013; Zemp *et al.*, 2013a, 2013b). En 2005, Lun *et al.* ont reporté pour la première fois que le MYXV était capable de détruire plusieurs cellules de gliomes de rat (RG2 et 9L) et 5 sur 6 lignées cellulaires humaines de gliomes. Plusieurs MOI (Multiplicity of Infection) ont été étudiées. On définit la MOI comme la quantité de virus statistiquement présente par cellule. Une infection à MOI de 10 correspond alors à un inoculum viral qui contient 10 fois plus de virus que de cellules. A la MOI de 10, après 3 jours, plus de 80% des cellules étaient détruites par le MYXV (Lun *et al.*, 2005). De plus, le virus était capable de se répliquer au sein de ces cellules puisque la charge virale était multipliée par 10 trois jours après infection. Puis d'autres lignées cellulaires de gliomes de rat comme C6 et F98 ont été détruites par le MYXV. Zemp *et al.* ont aussi démontré que des cellules de gliomes spontanés murins issues de souris génétiquement modifiées répondaient de la même façon au MYXV, y compris à des MOI plus faibles. En effet, à MOI = 1, entre 26 et 75% des cellules sont détruites par le MYXV (Zemp *et al.*, 2013b).

En 2004, une population cellulaire particulière a été mise en évidence au sein des gliomes. Ces cellules ont toutes les propriétés des cellules souches cancéreuses (marqueurs de cellules souches, auto-renouvellement, différenciation en cellules de feuillet embryonnaires différents) et sont appelés BTIC (Brain Tumor Initiating Cells) ou cellules à l'origine des tumeurs cérébrales (Singh *et al.*, 2004). Neuf ans plus tard, il a été montré que ces cellules étaient



sensibles au MYXV : elles permettent sa réplication et sont détruites après infection (Zemp *et al.*, 2013a).

De plus, plusieurs études ont montré que les cellules Natural Killers (NK) étaient impliquées dans l'immunité anti-tumorale. Or Ogbomo *et al.* ont montré que le MYXV était capable d'augmenter la destruction des cellules tumorales par les cellules NK grâce à une inhibition de l'expression du CMH de classe I.

Toutes ces études suggèrent donc fortement que le MYXV est un VO efficace *in vitro* contre les tumeurs gliales, mais l'étude de modèle animaux a permis d'apporter de nouvelles informations essentielles.

#### **I.4.2 Efficacité du MYXV sur des modèles rongeurs de gliomes**

La Tableau 9 résume les résultats des différentes études sur l'utilisation *in vivo* du MYXV.

##### **I.4.2.1. Une efficacité optimale sur les souris immunodéprimées**

La plupart des auteurs précédemment cités et qui ont montré l'efficacité du MYXV *in vitro* ont aussi testé l'efficacité du virus *in vivo* sur des modèles rongeurs immunodéprimés après xélogreffe orthotopiques de gliomes. Des cadres stéréotactiques adaptés ont permis l'injection de cellules de gliomes directement dans le cerveau des rongeurs. Sept jours plus tard, une injection i.t de MYXV était réalisée. Les rongeurs étaient alors surveillés de près et euthanasiés si des symptômes apparaissaient (problème pour se nourrir, pour se toiletter, pour marcher) ou si une perte de plus de 20% du poids était observée. Le même protocole a été réalisé pour l'ensemble des études listées dans le Tableau 9.

##### **I.4.2.2. La combinaison MYXV-Rapamycine semble efficace**

Malgré l'apparente efficacité du MYXV sur des modèles rongeurs immunodéprimés, l'étude de modèles rongeurs immunocompétents a mis en évidence les limites de l'utilisation du MYXV dans le traitement des gliomes (Lun *et al.*, 2010; Zemp *et al.*, 2013b). En effet le SI a un rôle primordial dans l'élimination du virus. Ainsi, le MYXV, seul, ne permet pas d'augmentation de la survie de rats immunocompétent ayant subi une xélogreffe orthotopique

de cellules de gliomes RG211. Les mêmes conclusions ont été établies sur l'étude de souris immunocompétente (Zemp *et al.*, 2013b) (Tableau 9).

Plusieurs stratégies ont alors été testées afin d'augmenter l'efficacité du MYXV sur des modèles immunocompétents. La stratégie la plus étudiée a été l'utilisation de la rapamycine. La rapamycine est une lactone macrocyclique capable d'inhiber la protéine mTOR (mammalian target of Rapamycin), située en aval de la voie de signalisation d'Akt (Cf. supra). La rapamycine possède une action immunomodulatrice antitumorale sur différentes cellules cancéreuses (Stanford *et al.*, 2007b). Stanford *et al.* ont alors démontré que la rapamycine pouvait augmenter la sensibilité des cellules au MYXV car elle était capable d'empêcher l'arrêt du cycle cellulaire des cellules infectées. Elle est aussi à l'origine d'une hyperactivation d'Akt (Stanford *et al.*, 2007b) dont on connaît l'importance dans l'efficacité antitumorale du MYXV (Wang *et al.*, 2006). C'est pourquoi la rapamycine a été testée *in vitro* et *in vivo*.

*In vitro*, Lun *et al.* ont traité deux lignées cellulaires de gliomes de rat (RG2 et F98) avec de la rapamycine avant l'infection par le MYXV. Ce prétraitement s'est révélé à l'origine d'une augmentation du titre viral post-infection et d'une augmentation de la cytotoxicité du MYXV (MOI=0.1, cytotoxicité multipliée par 10 avec la rapamycine) (Lun *et al.*, 2010).

*In vivo*, l'association MYXV et rapamycine s'est montrée efficace sur des modèles rongeurs immunodéprimés et immunocompétents ayant subi des xéno greffes ou isogreffes orthotopiques (Lun *et al.*, 2010; Zemp *et al.*, 2013a) (Tableau 9). En effet, l'association MYXV-rapamycine était efficace contre toutes les injections i.c de cellules de gliomes de rat ainsi que la moitié des injections i.c de cellules souches cancéreuses de gliomes murins. Cette efficacité a été démontrée par une diminution de la taille de la tumeur objectivée par imagerie (IRM et Bioluminescence: BLI) et par une augmentation de la médiane de survie des animaux utilisés.

#### **I.4.2.3. L'association avec les cellules Natural Killer est prometteuse**

Sachant que les cellules NK sont capables d'augmenter la cytotoxicité du MYXV *in vitro*, Ogbomo *et al.* ont évalué cette association *in vivo*. L'injection intratumorale du couple NK-MYXV a entraîné une diminution majeure de la taille du gliome objectivée par BLI (Ogbomo *et al.*, 2013). Cependant, la médiane de survie n'a pas augmenté de façon significative bien que la tendance soit prometteuse. En effet, 60% des souris présentant un gliome traitées

avec le MYXV contre 100% des souris traitées avec la combinaison MYXV-NK ont survécu plus de 159 jours (Tableau 9).

#### **I.4.2.4. Améliorer la délivrance du MYXV**

Un autre moyen d'augmenter l'efficacité du MYXV réside dans l'optimisation de sa délivrance intratumorale. Deux stratégies principales ont été testées : (i) la CED qui permet une injection intratumorale précise et efficace, (ii) les cellules dérivées d'adipocytes souches (ADSC) qui servent de véhicule afin d'atteindre la tumeur.

La CED permet d'injecter le virus dans la tumeur et dans le parenchyme environnant avec un taux de perfusion continue à pression positive. Ceci est permis par la présence de plusieurs cathéters placés à l'aide d'un cadre stéréotaxique au niveau du système nerveux central (Dickinson *et al.*, 2010). Ce mode de délivrance n'a permis qu'une légère augmentation de la survie des souris immunocompétentes ayant subi une xénogreffe orthotopique mais s'est montré très efficace en association avec la rapamycine (injection intrapéritonéale=i.p). En effet, alors que la médiane de survie des souris traitées avec l'association MYXV (i.t) – rapamycine (i.p) était de 28 jours, elle atteignait 42 jours lorsque le MYXV était administré en CED (Lun *et al.*, 2010).

L'utilisation des ADSC repose sur le principe de « homing » des cellules souches adultes vers les cellules cancéreuses. Josiah *et al.* ont démontré que le MYXV était capable d'infecter les ADSC sans les détruire et que ces cellules présentaient un tropisme particulier pour les cellules de GBM. Ainsi, les ADSC préalablement infectées étaient capables de détruire les cellules de GBM à la fois *in vitro* et *in vivo*. *In vivo*, ce mode d'injection a permis une augmentation de la médiane de survie des souris utilisées et cette augmentation était d'autant plus marquée lors d'injections répétées d'ADSC préalablement infectées (Josiah *et al.*, 2010).

#### **I.4.2.5. Une comparaison entre les différentes stratégies est-elle possible ?**

Comme décrit précédemment, beaucoup d'études démontrent une certaine efficacité du MYXV dans le traitement des gliomes sur des modèles animaux, et une comparaison entre ces différents résultats serait intéressante afin de dégager la meilleure stratégie. Cependant, de

multiples différences concernant les doses de virus utilisées, les lignées cellulaires, les modèles animaux (rats, souris) ou encore le temps entre l'implantation de la tumeur et l'injection du virus nous empêchent toute comparaison.

De plus, aucune étude ne compare l'efficacité du MYXV par rapport à des traitements conventionnels tel que la radiothérapie ou la chimiothérapie ce qui empêche de replacer l'efficacité du virus dans un contexte plus global. En 2006, Sarkarie *et al.* ont mesuré le temps de survie de souris immunodéprimées présentant une greffe orthotopique de gliome, et recevant un traitement à base de radiothérapie seule afin de tester l'effet de l'amplification de l'EGFR dans la résistance à la radiothérapie. Pour les 4 lignées cellulaires utilisées, la médiane de survie a varié entre 35 et 60 jours (Sarkaria *et al.*, 2006), ce qui est voisin des valeurs obtenues avec le MYXV. Même si la comparaison est difficile, il semble que le MYXV soit au moins aussi efficace que la radiothérapie dans le traitement des gliomes des souris immunodéprimés. D'autres études sont bien sûr nécessaires afin de déterminer le réel avantage du MYXV par rapport aux thérapies dites « conventionnelles ».

#### **I.4.2.6.    Persistence de l'infection *in vivo* : le rôle du système immunitaire**

Sur des modèles de souris immunodéprimées le MYXV persiste longtemps *in vivo*. Zemp *et al.* ont injecté des BTIC dans le cerveau de souris puis ont injecté i.t le MYXV : ces derniers rapportent une persistance du virus 21 jours après infection (pour 2 des 3 BTIC utilisées) (Zemp *et al.*, 2013a). Lun *et al.* ont réalisé des expériences similaires avec des cellules tumorales humaines « classiques » : cette fois-ci, le virus persistait jusqu'à 35 jours (Lun *et al.*, 2005). En revanche, sur des modèles de rats immunocompétents, le MYXV ne survit que 3 jours *in vivo*. Il est cependant intéressant de noter que l'utilisation de la rapamycine permet d'augmenter la persistance du virus *in vivo*, grâce à son effet immunomodulateur (Candolfi *et al.*, 2007a). De cette façon, sur des modèles de souris immunocompétentes, le virus est capable de persister jusqu'à 5 jours. Les auteurs ont aussi montré que la réponse à l'IFN de type I n'était pas impliqué dans l'élimination du virus, ce qui semble cependant surprenant compte tenu de la sensibilité du MYXV aux IFN. Ces deux études sur animaux immunocompétents supposent que le SI est responsable de l'élimination du MYXV.

### **I.4.3 Les limites du MYXV dans le traitement du gliome**

Au-delà de l'élimination rapide du MYXV *in vivo*, de nombreuses études, entre 2005 et aujourd'hui insistent sur les limites du MYXV en tant qu'agent thérapeutique. Nous allons nous concentrer sur ces limites avant de montrer comment il est possible de les dépasser.

#### **I.4.3.1. Un manque relatif d'efficacité**

Malgré les optimisations intéressantes précédemment mentionnées, le MYXV semble encore manquer d'efficacité. En effet, aucune des études n'aboutit à une rémission à long terme grâce au virus. De plus, il semble que certains types de gliomes soient plus résistants. En effet, seulement 2 BTIC sur 4 sont sensibles au MYXV et ceci se retrouve *in vivo* (Zemp *et al.*, 2013a) (Tableau 9). Ceci est en accord avec les conclusions de Wang *et al.* qui définissent 3 types de cellules de gliomes humains, dont les type III qui ne sont ni permissives ni sensibles au MYXV (Wang *et al.*, 2006). Par conséquent, il sera important de comprendre les mécanismes de résistance *in vitro* de ces cellules afin d'améliorer l'efficacité du MYXV. Par contre, *in vivo*, il semble que le SI ait un rôle majeur.

#### **I.4.3.2. Le système immunitaire à l'origine de l'élimination du virus**

Les études qui s'intéressent à l'utilisation du MYXV sur des rongeurs immunocompétents rencontrent toutes le même écueil : l'élimination du virus par le SI. La rapamycine, grâce à son action immunomodulatrice semble utile pour augmenter l'efficacité du virus mais les mécanismes responsables de l'élimination du virus étaient alors inconnus. Zemp *et al.* ont cherché à comprendre quels acteurs du SI étaient à l'origine de l'élimination du virus. Cette importance du SI avait déjà été démontrée pour l'herpesvirus pour lequel les cellules NK, la microglie/macrophages (cellules CD68<sup>+</sup> et CD163<sup>+</sup>), et l'IFN $\gamma$  jouaient un rôle prépondérant dans son élimination (Fulci *et al.*, 2006).

Tout d'abord Zemp *et al.* (Zemp *et al.*, 2014) ont caractérisé la population de cellules immunitaires du microenvironnement de leur modèle murin. Ils ont alors observé une augmentation de la microglie (CD45<sup>low</sup>, CD11b<sup>+</sup>) et des macrophages associés aux gliomes

(GIM) (CD45<sup>high</sup>, CD11b<sup>+</sup>) chez les souris atteintes de gliomes. Cette caractéristique se retrouve chez l'Homme (Hussain *et al.*, 2006). Puis, ils ont comparé les populations immunitaires avec ou sans injection i.t de MYXV. Trois jours après l'injection, ils ont rapporté une diminution de la microglie associée à une augmentation des cellules CD45<sup>high</sup> dont la plupart étaient constitués de GIM (70.3% +/- 3.6%) et de lymphocytes (30.6% +/- 3.4%). La question était ensuite de savoir quel était le rôle exact de ces cellules.

Afin d'y répondre, plusieurs souris KO ont été utilisées. La première était KO pour la protéine CCR2 (chemokine receptor 2) qui est indispensable au recrutement des monocytes (Lim *et al.*, 2011). Les souris ont donc moins de GIM et ceci est appréciable après un injection intracérébrale de cellules de gliomes KK1492. Cette diminution du nombre de macrophages est liée à une augmentation de la persistance virale (multipliée par 3.3, 8.1, 5.0 fois après 1,2 et 3 jours respectivement). Zemp *et al.* ont ensuite utilisé différentes molécules afin de supprimer les monocytes, soit de la circulation, soit ceux résidents au sein du gliome et ont ensuite évalué la persistance du MYXV. Ils ont alors conclu que la population de macrophages résidents était à l'origine de l'élimination du MYXV au sein des gliomes (sans macrophages circulants, la persistance du virus n'a pas augmenté). De la même façon, l'utilisation de souris KO pour le récepteur de l'IL-2 (indispensable au recrutement des cellules NK et T) a révélé une augmentation de la persistance virale.

Cette étude a donc clairement démontré l'importance du SI dans l'élimination du MYXV et a même permis d'identifier les effecteurs du SI impliqués: les macrophages résidents au sein des gliomes (et non pas les macrophages recrutés après infection), les cellules NK et les lymphocytes T. Cibler ces cellules apparaît alors comme une solution afin d'augmenter la persistance du virus et donc son efficacité dans le traitement des gliomes.

### **I.4.3.3. La délivrance du MYXV n'est pas optimale**

Chez l'Homme, il existe des formes de GBM appelées "multifocales" où la tumeur est capable de s'étendre d'un hémisphère cérébral à l'autre. Ces formes particulières représentent 12.8% des nouveaux cas de GBM entre 2003 et 2010 (Patil *et al.*, 2012) et ont un très mauvais pronostic. Or, Lun *et al.* ont montré en 2005 que l'injection i.t « classique » de MYXV ne permettait pas au virus d'atteindre l'autre hémisphère (Lun *et al.*, 2005).

#### **I.4.3.4. Le modèle rongeur n'est pas idéal**

La plupart des auteurs qui ont étudié l'utilisation *in vivo* du MYXV ont reconnu une limite majeure à leurs études : le modèle rongeur, notamment lorsqu'il est dépourvu d'un SI efficace. En effet, le microenvironnement d'une tumeur spontanée peut être très différent de celui d'une xénogreffe. De plus, sur un animal immunodéprimé, l'activité antitumorale et antivirale du SI est impossible à évaluer (Candolfi *et al.*, 2007a). Les informations apportées par les modèles rongeurs immunodéprimés est donc très partielle.

De plus, Claes *et al.* ont étudié le génotype, l'épigénétique et le phénotype des cellules de gliomes régulièrement utilisées en tant que modèle afin de discuter de leur pertinence (Claes *et al.*, 2008). Ces auteurs ont alors démontré que les gliomes secondaires à l'injection des cellules U87 et U251 (Josiah *et al.*, 2010; Lun *et al.*, 2005; Ogbomo *et al.*, 2013), présentaient un pattern d'infiltration diffus, très différent de celui retrouvé chez l'Homme. Ceci confirme le rôle du microenvironnement tumoral dans le développement d'une tumeur *in vivo* et montre que l'utilisation de xénogreffe/isogreffe peut manquer de pertinence, y compris sur modèle immunocompétent. En outre, une même lignée cellulaire peut avoir différents comportements : en effet le nombre de copie du gène EGFR est différent d'un stock de cellules U87 à l'autre (Claes *et al.*, 2008). Or, sachant l'importance de l'EGFR dans le comportement des GBM (Verhaak *et al.*, 2010), l'utilisation de la lignée U87 apparaît comme un biais majeur.

Les résultats issus des modèles rongeurs sont donc intéressants mais doivent être interprétés avec prudence à cause des limites majeures intrinsèques au modèle utilisé.

#### **I.4.4 L'avenir du MYXV**

##### **I.4.4.1. Améliorer l'efficacité du MYXV**

Tout d'abord, il est possible d'optimiser l'efficacité du MYXV en considérant les limites décrites précédemment : dans cette optique, différentes stratégies sont utilisées.

Le MYXV peut être modifié afin d'amplifier la réponse immune antitumorale. Grâce à l'insertion de gènes codant pour la protéine de fusion IL15R $\alpha$ - IL15, Tosic *et al.* ont accru l'efficacité du MYXV dans le traitement des mélanome sur des modèles murins. En effet, l'IL-15 associé à son récepteur permet de recruter des cellules NK et des lymphocytes CD8+ qui

possèdent une activité antitumorale à la fois *in vitro* et *in vivo*. Ce virus recombinant a alors permis une stabilisation de la taille de la tumeur et une augmentation de la médiane de survie. De plus, ces auteurs ont constaté que des cellules de gliomes murins GL261 étaient permissives à ce nouveau MYXV (Tosic *et al.*, 2014).

Au lieu d'amplifier la RI antitumorale, il est aussi possible d'inhiber la RI afin de prévenir l'élimination du MYXV par le SI et c'est la stratégie utilisée par Zemp *et al.* En effet, l'utilisation du cyclophosphamide (CPA) en tant qu'agent immunosuppresseur a permis une diminution du nombre de lymphocytes et des GIM entraînant alors une persistance accrue du MYXV dans un modèle murin de gliome. Cette persistance virale a alors permis d'augmenter la survie des souris traitées (Zemp *et al.*, 2014).

Ces deux stratégies semblent contradictoires puisque l'une amplifie l'action du SI tandis que l'autre tend à inhiber son action. Des progrès sont donc à faire afin de comprendre les mécanismes de l'élimination du MYXV *in vivo* afin d'optimiser son efficacité à l'avenir.

#### **I.4.4.2. Optimiser la délivrance et la répartition du MYXV au sein du cerveau**

L'une des limites à l'utilisation du MYXV est son incapacité à atteindre l'ensemble du cerveau afin d'envisager le traitement des gliomes multifocaux par exemple. Une option pourrait être l'utilisation d'un MYXV recombinant exprimant la protéine F11L. Cette protéine est exprimée par et VACV et augmente la propagation du virus grâce à une action sur le cytosquelette des cellules. Ce virus recombinant est capable d'infecter et de lyser des lignées cellulaires de cancer du sein humain *in vitro*. De plus, il permet d'augmenter la survie des modèles murins ayant subi une xélogreffes de cellules de cancer du sein humain. Mais l'avantage majeur de ce virus est sa capacité d'action systémique. En effet, Irwin *et al.* ont injecté des cellules tumorales mammaires à deux endroits sur des modèles rongeurs, seulement l'une des deux tumeurs a été traitée avec le virus recombinant i.t. Le virus a été capable de se propager jusqu'à l'autre tumeur, entraînant une diminution de sa vitesse de croissance bien que la survie n'ait pas augmenté significativement (Irwin *et al.*, 2013). Des virus de ce type pourraient être très avantageux dans le traitement des gliomes.

Les cellules souches sont capables d'amener un virus jusqu'à une tumeur grâce au principe du homing (Josiah *et al.*, 2010). Les ADSC décrites précédemment sont intéressantes mais leur



production est complexe et chronophages. Les cellules souches de la moelle osseuse (BMSC), quant à elles, sont beaucoup plus faciles à isoler et ont un tropisme particulier pour les gliomes (Pendleton *et al.*, 2013). Leur utilisation en tant que véhicule du MYXV pourrait permettre de cibler l'action du MYXV *in vivo* en évitant les contraintes inhérentes à l'obtention de cellules souches adipeuses. D'autres études sont nécessaires pour confirmer cette possibilité sur des modèles animaux.

#### **I.4.4.3. Le modèle canin : un modèle d'intérêt**

Les modèles rongeurs apportent beaucoup d'informations mais restent très éloignés de l'Homme et sont donc peu représentatifs. C'est une des raisons pour lesquelles, malgré l'espoir que font naître les études précliniques sur les VO, les résultats lors des essais cliniques sur l'Homme sont parfois décevants (Burke *et al.*, 2015), ceci étant valable pour l'ensemble des VO préalablement présentés. Le modèle canin, quant à lui, apparaît comme un modèle pertinent dans l'étude des VO et plus particulièrement dans le cadre des gliomes.

On retrouve notamment les gliomes chez les races brachycéphales comme les Bouledogue français et les Boston Terrier. L'incidence des tumeurs intracrâniennes chez le chien est voisine de l'Homme puisqu'on trouve environ 14.5 cas/100000 chiens bien que la prévalence de ces tumeurs soit aujourd'hui mal connue (Dickinson *et al.*, 2006).

L'Homme et le chien vivent dans le même environnement et les gliomes canins spontanés sont aussi hétérogènes que leur équivalent humain. En effet, l'étude d'une tumeur spontanée représente la véritable nature de l'initiation du cancer. En outre, le modèle canin permet de prendre en compte l'implication du SI dans l'élimination du MYXV (Urbasic *et al.*, 2012). Les signes cliniques ainsi que le pronostic des gliomes canins sont très similaires aux gliomes humains. De plus, des effets secondaires subtils dus à la tumeur elle-même ou au traitement utilisé peuvent être observés de manière fine grâce à l'appui des vétérinaires (Candolfi *et al.*, 2007a).

Comme l'ont montré Stoica *et al.*, le phénotype et les modifications génétiques des astrocytomes canins sont très proches de ce qu'on retrouve chez l'Homme. La morphologie de la tumeur, son immunophénotype, son génotype, la surexpression de la protéine p53 et de l'EGFR sont semblables à la fois chez le chien et chez l'Homme (Stoica *et al.*, 2004). De même, Candolfi *et al.* ont comparé les caractéristiques histopathologiques et la progression tumorale des GBM canins, murins et humains. Ils ont alors conclu, qu'à l'instar du modèle murin, les GBM humains et canins partageaient les mêmes caractéristiques de nécrose tumorale, de profil

d'infiltration et de composition cellulaire du microenvironnement (Candolfi *et al.*, 2007a). L'étude de l'expression de l'EGFR, du PDGFR et de l'Insulin-like Growth Factor-Binding Protein 2 (IGFBP2) sur 57 gliomes canins révèle des similitudes marquées avec les résultats obtenus chez l'Homme (Candolfi *et al.*, 2007a). De plus, Boudreau *et al.* ont comparé les niveaux d'expression protéique de plusieurs protéines impliquées dans la genèse des gliomes humains (TP53, MDM2, P21, AKT, PTEN, RB1, P16, MTOR and MAPK) avec leur équivalent canin (22 échantillons) et ont trouvé des ressemblances évidentes (Boudreau *et al.*, 2015).

Ces ressemblances marquées entre l'Homme et le chien ont poussé Urbasic *et al.* à tester l'efficacité du MYXV sur différentes lignées cellulaires de cancers canins (hémangiosarcome, ostéosarcome, carcinome transitionnel de la vessie). Les virus utilisés, délétés du gène SERP2, sont capables de lyser l'ensemble des cellules cancéreuses canines étudiées (Urbasic *et al.*, 2012).

Enfin, la CED précédemment évoquée peut être utilisée chez le chien. Dickinson *et al.* ont démontré que le chien était un modèle d'étude pertinent de la CED intracrâniennes comme dans le cas des gliomes (Dickinson *et al.*, 2010).

Ces études soulignent donc l'intérêt du modèle chien dans la recherche sur l'efficacité du MYXV dans le traitement des gliomes canins.

Référence	Lignées cellulaires	Type de modèle	Virus, dose, voie d'administration	Effets sur la survie
Lun et al., 2005 (7)	Lignées cellulaires humaines : -U87: nt= 50j -U251 : nt= 50j (5x10 <sup>5</sup> c)	<b>Immunodéprimées</b> Souris CD-I nude <b>Xéogreffes orthotopiques</b>	MYXV seul (5x10 <sup>6</sup> PFU, i.t, 12 j a.i)	<b>Survie augmentée (/DV)</b> -U87 : p=0.0002, MST>150j -U251 : p=0.0027, MST>150dj
Lun et al. 2010 (11)	Lignée cellulaire de rat RG2 (1x10 <sup>4</sup> c)  nt= 18j	<b>Immunocompétentes</b> Rats 344 fisher  <b>Isogreffes orthotopiques</b>	MYXV seul (1x10 <sup>7</sup> PFU, it, 5j a.i)	<b>Pas d'effet</b> MST~20 j (p=0.078/DV)
			MYXV (1x10 <sup>7</sup> FFU , i.t) + Rapamycine (5mg/kg, 5 fois/sem, 2sem, i.p)	<b>Survie augmentée</b> MST~28 j (p=0.0398/MA, p=0.0011/DV)
			MYXV (1x10 <sup>7</sup> FFU, CED)	<b>Légère augmentation de la survie</b> MST~22 j (p=0.0045/DV)
			MYXV (1x10 <sup>7</sup> FFU , CED) + Rapamycine (5mg/kg, 5fois/sem, 2sem, i.p)	<b>Augmentation significative de la survie</b> MST~42 j (p<0.0009/MYXV CED, p=0.0398/MYXV it + Rapamycine)
Josiah et al., 2010 (12)	Lignées humaines U87 et U251 (1x10 <sup>5</sup> c)  nt=19j	<b>Immunodéprimées</b> Souris athymic nude  <b>Xéogreffes orthotopiques</b>	ADSC infectées avec MYXV (ratio 1:1, avec cellules de gliomes)	<b>Augmentation significative de la survie</b> MST>120 j (p=0.0067/ADSC seules)
			ADSC infectées avec MYXV (2.5x10 <sup>5</sup> c, 7j a.i, i.c, non i.t)	<b>Légère augmentation de la survie</b> MST= 29 j (p=0,0058/ADSC seules)
			ADSC infectées avec MYXV (6 injections, i.c non i.t)	<b>Augmentation modérée de la survie</b> MST = 56.5 j (p=0.0007/ADSC seules)
Ogbomo et al., 2013 (13)	Lignées humaines U87 (1x10 <sup>5</sup> c)  nt =50j	<b>Immunodéprimées</b> Souris CB17 SCID  <b>Xéogreffes orthotopiques</b>	MYXV alone (5x10 <sup>6</sup> FFU, 19j a.i, it.)	<b>Augmentation modérée de la survie/DV</b> MST~70 j, p=0.0110
			MYXV (5x10 <sup>6</sup> FFU, 19j a.i, it.) + NK (1.5x10 <sup>5</sup> , it, 48h plus tard)	<b>Pas d'effet significatif /MYXV seul</b> 100% des souris survivent >159 j (p= 0.1343) mais diminution significative de la taille de la tumeur (3.96+/-1.35 vs 0.33+/-0.09 fois augmentée, p=0.0277)

Zemp et al., 2013 (14)	BTIC humaines (BT012 nt=100j, BT025 nt=50j, BT042 nt = ?, BT048 nt=90j)	Immunosupprimées	MYXV seul (5x10 <sup>6</sup> PFU, it, 21j a.i)	<b>Augmentation significative de la survie (/DV)</b> -BT012: MST = 127j (p=0.0001) -BT048: MST= 121j (p=0.0012) -BT025: MST= 72.5j (p=0.0016) -BT042: MST~180j (p=?)
		Souris SCID  <b>Xénogreffes orthotopiques</b>	MYXV (5x10 <sup>6</sup> PFU, 2 fois, 3 sem and 7 sem a.i) + Rapamycine (2.5mg/kg, i.p, SID, 6 sem)	<b>Pas d'effet (/MYXV seul)</b> BT012:MST~175 j (p=0.0543) BT048:MST~120 j (p=0.1608)  <b>Survie augmentée (/MYXV seul)</b> -BT025:MST~83 j (p=0.00895) -BT042:MST~250 j (p=0.0011)
Zemp et al., 2013 (15)	K1492, K1861 nt=28j Issues de souris C57B/6J (Trp53+/-; Nf1+/-) (5x10 <sup>4</sup> c)	Immunocompétentes  Souris CB57Bl/6J  <b>Isogreffes orthotopiques</b>	MYXV (5x10 <sup>6</sup> PFU, 14j a.i, it)	<b>Pas d'effet</b> -K1492: p=0.3418 -K1861:p=0.6653
Zemp et al. 2014	K1492 (5x10 <sup>4</sup> c)	Immunocompétentes  Souris CB57Bl/6J  <b>Isogreffes orthotopiques</b>	MYXV (5x10 <sup>6</sup> PFU, 14 j a.i, it) + CPA (-2, 0, +2 jour par rapport à l'injection de MYXV)	<b>Survie augmentée</b> MYXV seul : ~17 jours MYXV + CPA : ~25 jours (p=0.0045)

**Tableau 9:** Protocoles et résultats des études étudiant l'effet du MYXV sur des modèles rongeurs

Abréviations : BTIC = Brain Tumor Initiating Cells, SCID = Severe Combined Immunodeficiency, UFP = Unité formant colonie, FFU = Foci Forming Unit, MST = Médiane de survie, nt = non traitées, ADSC = Adipose Derived Stem Cells, a.i)= après implantation tumorale, i.t = intra-tumorale, i.c = intra-crânienne, i.p = intra-péritonéal, CPA = Cyclophosphamide, c= cellules, j = jours, sem = semaine

## II- Etude expérimentale

### Introduction

Dans les années 1970, la variole humaine était éradiquée grâce à l'utilisation d'un virus particulier dont l'origine reste encore floue : le VACV (Turner, 1982) appartenant à la famille des *Poxviridae*. Une vingtaine d'année plus tard, une activité oncolytique du VACV fut découverte. En effet, ce virus était capable de lyser spécifiquement des cellules tumorales humaines en épargnant les cellules normales, à la fois *in vitro*, et après xéno greffe sur modèles rongeurs (Kim, 2015; Timiryasova *et al.*, 1999). Ces études ont permis de constater que le VACV, et plus largement les *Poxviridae*, présentaient des caractéristiques particulièrement intéressantes dans le cadre de la thérapie oncolytique : leur innocuité, leur facilité de stockage, de production et de manipulation (génomme de grande taille, ADN), leur absence d'intégration au génome de l'hôte ou encore la multiplicité des agents thérapeutiques disponibles pour détruire ces virus offrant alors une sécurité supplémentaire (Chan and McFadden, 2014).

Par la suite de nombreuses manipulations génétiques ont permis d'augmenter l'innocuité du VACV, limitant ainsi fortement les effets secondaires observés régulièrement avec les souches virales d'origine (Chan and McFadden, 2014). Aujourd'hui, des essais cliniques testant l'efficacité du VACV sur différents cancers humains sont en cours. Cependant, l'existence même de ces recombinaisons génétiques assurant une innocuité maximale diminue le potentiel oncolytique du virus. Des *Poxviridae* naturellement inoffensifs semblent donc plus appropriés. Le MYXV est un candidat a priori idéal grâce à son spectre d'hôte très étroit (uniquement les lagomorphes). De plus, ce virus présente une activité oncolytique majeure envers diverses cellules tumorales (Chan *et al.*, 2013a; Wang *et al.*, 2004). Cette sélectivité pour les cellules tumorales serait due à (i) la diminution des défenses antivirales des cellules tumorales (Bartee *et al.*, 2014) ou à (ii) l'activation des voies de signalisation impliquées dans la phosphorylation d'Akt (Wang *et al.*, 2006). Cependant, tous les mécanismes de sélectivité n'ont pas encore été investigués.

L'utilisation de ces VO est particulièrement adaptée aux cancers pour lesquels les thérapies conventionnelles sont peu efficaces. Les gliomes, et plus particulièrement les glioblastomes, en font partie. En effet, la médiane de survie des patients atteints de glioblastomes est seulement de 14-16 mois, et ce, malgré l'utilisation de molécules de chimiothérapie récentes comme le Temozolomide (Woehrer *et al.*, 2014). De plus, les GBM présentent une diversité moléculaire majeure qui complique l'utilisation de thérapie ciblée sur une ou plusieurs voies de

signalisation (Alifieris and Trafalis, 2015): un agent thérapeutique capable de faire abstraction de cette diversité est donc fortement recherché.

De nombreuses études précliniques *in vitro* ou sur des modèles rongeurs immunodéprimés ont démontré l'efficacité du MXYV dans la thérapie des gliomes (Lun *et al.*, 2005, 2010; Ogbomo *et al.*, 2013; Zemp *et al.*, 2013b, 2014). Le seul obstacle à son utilisation semble être l'activation du système immunitaire péri-tumoral comme cela a été montré sur le modèle rongeur (Zemp *et al.*, 2014). Cependant, l'utilisation de ce modèle peut être remise en question. En effet, les xénogreffes sur rongeurs immunodéprimés ne prennent pas en compte l'importance du système immunitaire dans l'élimination du virus, de plus le profil histologique d'infiltration des gliomes est souvent différent chez la souris et chez l'Homme. En outre, les modèles rongeurs syngéniques immunocompétents s'appuient sur des modifications génétiques qui recréent de façon artificielle des tumeurs et ne représentant donc pas l'hétérogénéité des gliomes décrite chez l'Homme (Chen *et al.*, 2013b). Ces éléments confirment le besoin d'un nouveau modèle qui permettrait d'augmenter la congruence entre les essais précliniques et cliniques. Le modèle canin apparaît comme un modèle d'intérêt. En effet, ce modèle permet l'étude de tumeurs spontanées qui présentant donc des origines variées. De plus, les gliomes canins et humains présentent des ressemblances histologiques, moléculaires et génétiques marquées (Boudreau *et al.*, 2015; Candolfi *et al.*, 2007a; Dickinson *et al.*, 2006, 2010). En outre, les symptômes de la maladie ou les effets secondaires des traitements peuvent être suivis avec précision grâce à l'appui des vétérinaires (Chen *et al.*, 2013b). L'utilisation du modèle chien dans la recherche sur l'utilisation du MYXV dans le traitement des gliomes peut donc s'avérer particulièrement pertinente.

Dans cette étude, nous voulons montrer que le MYXV est intéressant *in vitro* contre les gliomes canins dans l'optique d'utiliser le chien comme modèle d'étude des gliomes humains.

Dans ce contexte, nous avons testé l'utilisation de deux souches différentes de MYXV, une souche de terrain (T1) et une souche vaccinale (SG33) sur différentes lignées cellulaires de gliomes canins. Nous avons tout d'abord testé ces deux virus sur une lignée de gliome canin bien connue (J3T) avant d'étendre nos investigations à différentes lignées cellulaires afin de (i) connaître la permissivité des cellules pour les différentes souches virales (ii) connaître la cytotoxicité de ces virus (iii) comparer l'efficacité de ces deux souches sur les différentes lignées. Nous avons ensuite brièvement tenté de comprendre les différences observées entre ces lignées cellulaires.

## II.1. Matériels et méthodes

### II.1.1 Virus

Deux souches virales de MYXV ont été étudiées :

- la souche T1 (Toulouse 1) est une souche de terrain dérivée de la souche Lausanne et isolée à Toulouse en 1954.
- la souche SG33 qui a été atténuée par un grand nombre de passages en série à 33°C sur des cellules rénales de lapin et des cellules d'embryon de poulet, dans le but d'obtenir un vaccin atténué contre la myxomatose. Ces passages sériés ont entraîné une délétion importante de l'extrémité droite du génome du virus (Camus-Bouclainville *et al.*, 2011).

### II.1.2 Lignées cellulaires

Plusieurs lignées cellulaires de gliomes canins ont été utilisées au cours de l'étude.

La lignée J3T est une lignée cellulaire canine dont la description histologique initiale est proche d'un astrocytome anaplasique provenant d'un Boston Terrier de 10 ans (Berens *et al.*, 1993). Cette lignée a été fournie par le Dr Michael Berens (Translation Genomics Research Institute, Phoenix).

La lignée D3T (ou J3T-Bg) est issue de la lignée J3T qui a subi plusieurs passages au sein du cerveau de souris Biege SCID. La lignée cellulaire est alors plus agressive que les J3T originelles : *in vivo*, elle est capable, à l'inverse des J3T, de former facilement des tumeurs sur les modèles rongeurs. G06 est une lignée cellulaire canine issue d'un GBM avec une composante oligodendrogliale provenant d'un berger australien de 2 ans. SDT3 est une lignée cellulaire canine issue d'un GBM provenant d'un Bouledogue Anglais de 14 ans. Les trois lignées précédemment décrites ont été fournies par le Dr Dickinson (UC Davis, USA).

La lignée Raffray, issue d'un oligodendrogliome anaplasique provenant d'un Boxer de 10 ans, a été fournie par le Dr Abadie (Oniris, France).

La lignée RK13 (Rabbit Kidney 13) est une lignée cellulaire de rein de lapin qui a été fournie par l'American Type Culture Collection (CCC37). Cette lignée sert de contrôle positif puisqu'on sait qu'elle est permissive et sensible au MYXV (Duteyrat *et al.*, 2006).

Toutes ces cellules ont été cultivées à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> dans un milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco) complété avec 10% de sérum de veau fœtal

(SVF) et 100 unité/mL de pénicilline/streptomycine (Gibco-BRL). Ce milieu sera par la suite identifié comme DMEM 10% SVF.

### **II.1.3 Titrage des virus sur RK13**

Afin d'évaluer la permissivité des cellules au MYXV, les cellules de gliomes canins (J3T, D3T, G06, SDT3, Raffray) et de rein de lapin (RK13) ont été cultivées dans du DMEM 10% SVF pendant 24-48 heures jusqu'à 80-90% de confluence. Le nombre de cellules présent à ce moment a été soit estimé grâce aux temps de doublement cellulaire calculée lors d'expériences préliminaires, soit compté au bleu trypan. La détermination du nombre de cellule présent a alors permis d'infecter les cellules à la MOI voulue. La MOI représente le nombre de particules virales infectieuses statistiquement présentes par cellule.

Puis ces cellules ont été infectées avec 200-500  $\mu$ L de virus SG33 ou T1 dilué dans OptiMEM 2% SVF et 1% P/S à des MOI connues, ou bien non infectées (ce point sert alors de contrôle négatif). Après 1 heure et 30 minutes d'adsorption à 37°C/5% CO<sub>2</sub> et un lavage avec du PBS, l'inoculum a été retiré et du milieu DMEM 5% SVF a été ajouté puis les cellules ont été cultivées pendant la durée des différentes cinétiques réalisées.

Pour chaque point d'intérêt (12h, J1, J2, J3, J4, J5), les cellules ont alors été collectées et soumises à 3 cycles de congélation-décongélation permettant de libérer les virions présents au sein des cellules. Les cellules ainsi lysées associées à leur milieu de culture ont alors été congelées à -20°C jusqu'à utilisation : ce mélange contient alors la totalité des virus présents dans le puit de culture à un instant t, c'est-à-dire les virus intracellulaires en cours de formation et les virus libérées après lyse des cellules.

Les virus ainsi collectés ont ensuite été titrés sur RK13. Les RK13, cultivées en plaque 6 puits à 70-80% de confluence, ont été infectées avec 200  $\mu$ L de virus après dilutions sériées (Fig. 15). Après 1 heure 30 minutes d'adsorption, l'inoculum viral a été retiré, les cellules ont été lavées avec du PBS et du DMEM 5% SVF a été ajouté. Après 48 heures d'incubation à 37°C/5% CO<sub>2</sub>, le surnageant a été retiré et remplacé par un milieu solide contenant du milieu MEME (Eagle Minimum Essential Medium, Gibco) complété avec 1% P/S, 2% SVF, 25 mM HEPES, 0.2% NaHCO<sub>3</sub> et 1% d'agarose low melting (Invitrogen). Vingt-quatre à 48 heures après, les plages de lyse ont été comptées et le titre viral a été déterminé en UFP/mL (Fig.15). Si 15 plages de lyse sont comptées à une dilution 10<sup>-4</sup>, la concentration virale est alors de 15.10<sup>4</sup> UFP/mL, or l'infection ayant été réalisée avec seulement 200  $\mu$ L de virus, le titre initial aussi est de 15.10<sup>4</sup> x 5 = 7,5.10<sup>5</sup> UFP/mL.



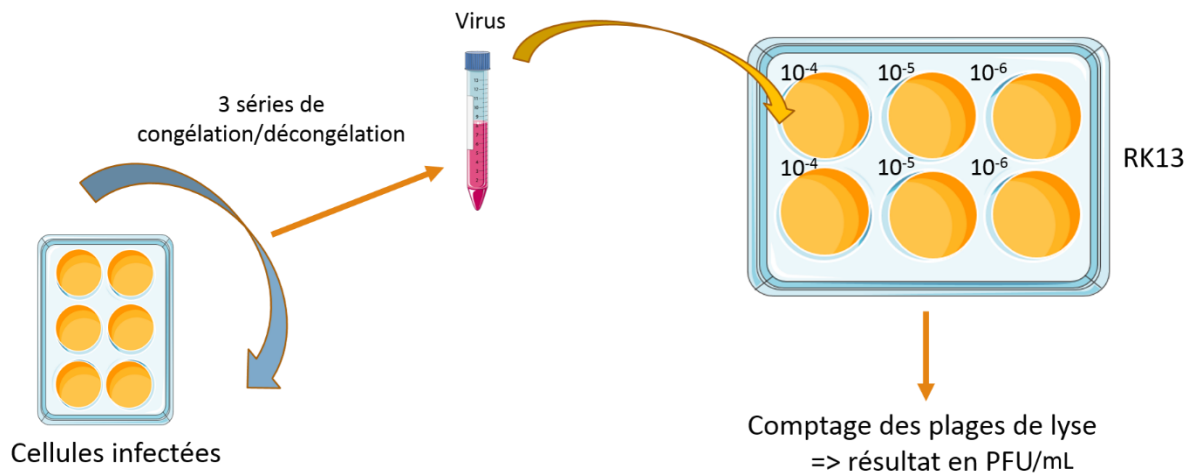


Figure 15: Schéma explicatif du titrage sur RK13

Abréviations :  $10^{-4}$  représente une dilution de 40000 fois des virus initialement prélevés sur les cellules préalablement infectées, UFP = PFU = Unité formant colonie

## II.1.4 Quantification de la charge virale par PCR quantitative

A partir de 200 uL des virus obtenus comme précédemment décrit (infection des différentes lignées cellulaires et 3 séries de congélation-décongélation), l'ADN a été extrait à l'aide du QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) selon les instructions du fabricant.

L'amplification du gène M071L du MYXV a alors été réalisée dans une plaque 96 puits à l'aide du LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche). Le mélange de la réaction PCR (Polymerase Chain Reaction) contient : le LightCycler480 SYBR Green Master mix (Roche) (qui contient l'ADN polymérase, les nucléotides, et le SYBR Green), les amorces (Forward M071L: GAC-ATT-TTA-GCC-TAT-GGG-AAG-AGT-ATG-TA, Reverse M071L: CAA-GCA-ACG-TCG-TAT-CGT-CCT), l'eau ultrapure et l'ADN préalablement extrait. La première étape de la PCR permet la dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 10 minutes, puis 45 cycles de 15 sec à 95°C suivi de 40 sec à 60°C sont réalisés. Chaque réaction a été réalisée en double.

Le SYBR Green s'intercale entre deux paires de bases de la double hélice d'ADN et ne fluoresce que s'il est fixé à l'ADN. La détection de la fluorescence est alors réalisée à la fin de

chaque cycle. L'analyse de la courbe de fusion a été réalisée pour chaque PCR afin de confirmer la spécificité des amorces utilisées à l'aide du logiciel LightCycler 480 Software (Roche).

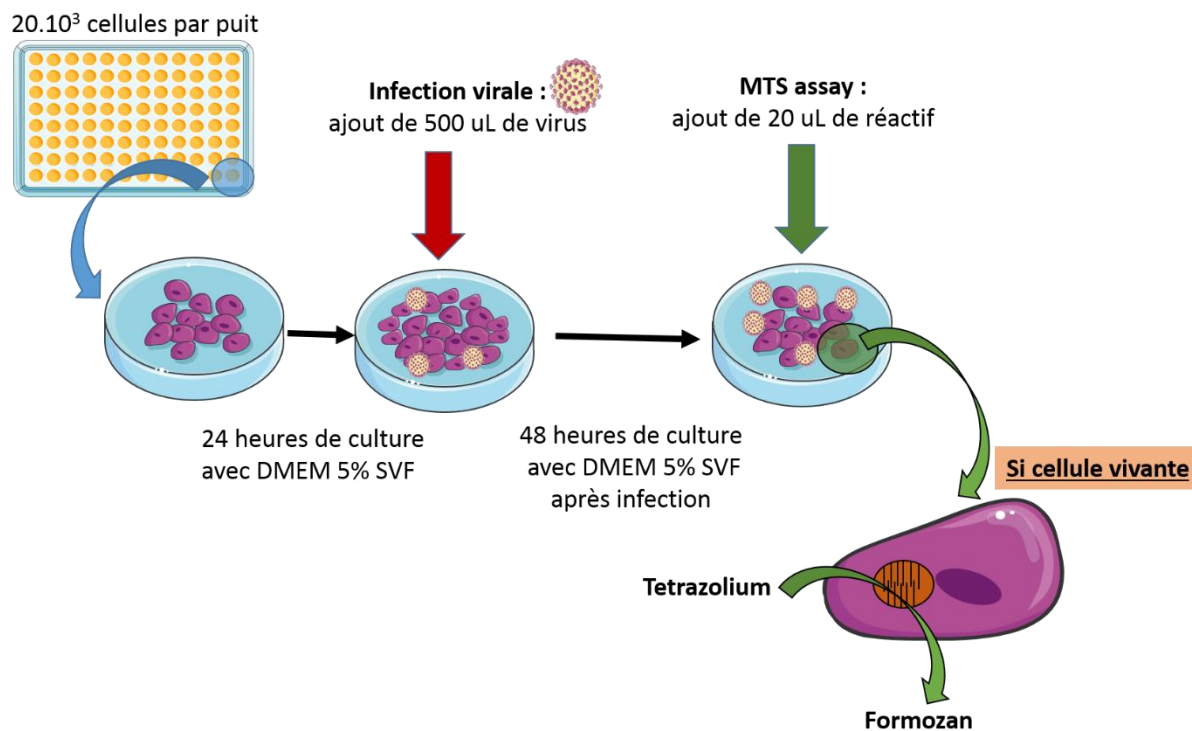
La gamme permettant de corréler les produits d'amplification géniques au nombre de copie génome a été réalisée à partir d'un plasmide viral purifié (PSCA-M071L Myxolamp). Ce dernier a alors été dilué de 10 en 10 afin de créer une courbe standard. L'efficacité de la PCR (pente de la courbe standard) et sa linéarité ( $R^2$ ) étaient de bonne qualité pour l'ensemble des qPCR (PCR quantitative) réalisés. De plus, plusieurs contrôles ont été effectués : des puits sans ADN qui ont permis d'attester de l'absence de dimères d'amorces et des puits contenant uniquement T1 ou SG33 qui ont montré que les amorces étaient adaptées et que la réaction PCR avait correctement fonctionné. Les résultats sont alors exprimés en nombre de copies génome/mL.

### **II.1.5 Détermination de la viabilité cellulaire après infection**

La viabilité cellulaire a été mesurée grâce à un MTS assay (CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega). Ce test utilise la réduction du tétrazolium (MTS) en formozan par les déshydrogénases mitochondriales qui ne fonctionnent qu'au sein des cellules saines. La quantité de formozan produite est ensuite mesurée à 490 nm d'absorbance et est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Les différentes cellules (J3T, D3T, SDT3, G06, Raffray, RK13) ont été déposées dans une plaque 96 puits à  $20 \cdot 10^3$  cellules/puits. Elles ont ensuite été incubées 24 heures à  $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$  avec 500  $\mu\text{L}$  DMEM 5% SVF : à ce moment la confluence était évaluée à 50-60%. Puis 500  $\mu\text{L}$  de virus (SG33 et T1) ont été ajoutés à une MOI connue, en triple. Des contrôles négatifs, sans infection, ont aussi été réalisés pour chaque lignée cellulaire. Après un temps donné (Fig. 16), 20  $\mu\text{L}$  de réactif du MTS assay ont été ajoutés à chaque puit afin d'évaluer le nombre de cellules viables par puit. Enfin l'absorbance a été mesurée grâce à un lecteur ELISA à 490 nm après 2 heures d'incubation.

La viabilité cellulaire a été calculée comme le ratio de l'absorbance obtenue avec les cellules viables infectées par rapport aux cellules viables non infectées.



**Figure 16:** MTS Assay : mesure de la viabilité cellulaire après infection

Vingt mille cellules ont été disposées dans chaque puit et cultivées pendant 24 heures avec DMEM 5% SVF. Puis l'infection virale a été réalisée à différentes MOI en ajoutant 500  $\mu$ L de virus dans DMEM 5%. Quarante-huit heures plus tard, le MTS assay a été réalisé afin de mesurer le nombre de cellules viables. Les puits non infectés ont servi de contrôle négatif et ont ensuite permis de calculer la viabilité relative par puit infecté.

## II.1.6 Western blot : détermination du niveau endogène de p-Akt dans les différentes lignées cellulaires

Les cellules tumorales ont été cultivées dans du DMEM 10% SVF jusqu'à 80-100% de confluence. Puis ces cellules ont été lavées avec du PBS (Phosphate Buffered Saline) et incubées avec le tampon RIPA pendant 5-10 minutes à 4°C. Ce tampon permet de lyser les cellules et d'en extraire les protéines. Les cellules ont ensuite été centrifugées à 9000 g pendant 15 minutes à 4°C et le surnageant a été conservé à -20°C jusqu'à utilisation. Ce surnageant regroupe l'ensemble des protéines cellulaires.

La concentration de protéines a ensuite été déterminée à l'aide d'un Bradford reagent (Sigma) selon le protocole fourni par le fabricant. Puis, le Western blot a été réalisé : des quantités équivalentes de protéines (12  $\mu$ g) ont migré par électrophorèse SDS-PAGE, sur gel NuPage Bis-Tris 4-12% (Invitrogen), dans du tampon de transfert MOPS (Invitrogen). Les

protéines ont ensuite été transférées sur membrane de nitrocellulose (0.45  $\mu\text{m}$ ) (Invitrogen). Cette membrane, après lavage avec TBT-Tween 0.1%, a été incubée pendant une nuit avec les anticorps primaires d'intérêt à 4°C. Les anticorps (Ac) primaires utilisés sont : Ac anti-PhosphoAkt (Ser473) monoclonal de lapin (1/2000) (Cell Signaling Technology), Ac anti-Akt polyclonal de lapin (1/1000) (Cell Signaling Technology). Après 3 lavages, la membrane a été incubée 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire anti-rabbit IgG HRP linked (Cell Signaling Technology) avant d'être révélée grâce à un réactif adapté (Western blot Signal Enhancer, Pierce). La luminescence permise par les Ac secondaires a alors été mesurée grâce au ChemiDoc MP System (BioRad). L'évaluation semi-quantitative de la quantité d'Akt et de p-Akt a été réalisée à l'aide du logiciel Image J (Rasband, NIH, USA). La quantité de p-Akt est exprimée en unité arbitraire (quantité de luminescence) ou comme le rapport de  $\frac{pAkt}{Akt}$ .

### **II.1.7 Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel R (ANOVA analysis). Les p-value mentionnées sont considérées significative si inférieure à 0,05.

## **II.2. Résultats**

### **II.2.1 La lignée J3T : une lignée permissive et sensible au MYX**

#### **II.2.1.1. Une permissivité majeure au MYXV souche SG33**

La lignée cellulaire J3T a été établie en 1993 par le Dr Berens (Berens *et al.*, 1993) et, depuis, plusieurs études ont confirmé l'intérêt de cette lignée dans l'étude des gliomes de l'Homme. En effet, l'étude initiale montrait déjà des ressemblances à la fois histologiques (le profil d'infiltration intracérébral des J3T injectées dans le cerveau des souris ressemblait à celui de l'Homme) et moléculaire (expression de l'EGFR) entre les J3T et les gliomes humains. De plus, Inoue *et al.* ont montré que des lignées cellulaires dérivées de J3T présentaient des profils d'infiltration différents qui pouvaient donc représenter différentes tumeurs humaines (Inoue *et al.*, 2012). Plusieurs études ont aussi investigué les voies de signalisation exacerbées des J3T et montré que certaines d'entre elles étaient communes à l'Homme (Boudreau *et al.*, 2015). La lignée J3T a été utilisée en tant que modèle pour tester des nouveaux agents thérapeutiques contre les gliomes humains comme la cilengitide (inhibiteur d'intégrine) (Onishi *et al.*, 2013).

Enfin, Hampl *et al.* (Hampl *et al.*, 2003) puis Candolfi *et al.* (Candolfi *et al.*, 2007b) ont utilisé avec succès la lignée J3T en tant que modèle d'étude de l'Homme en thérapie génique. Cette lignée est donc particulièrement adaptée à l'étude des traitements anti-gliomes et c'est pour cela que nous avons d'abord vérifié leur permissivité au MYXV. Deux souches virales ont été comparées : la souche sauvage T1 et la souche vaccinale SG33 qui est donc a priori inoffensive à la fois chez le lapin mais aussi chez l'Homme.

Avant d'évaluer l'effet cytotoxique du MYXV sur ces cellules de gliomes canins, il est important de s'assurer que sa réplication est possible, c'est-à-dire vérifier la permissivité des cellules au virus. En effet, un des critères majeurs d'un VO est sa capacité à se multiplier et donc à infecter les cellules adjacentes. La capacité de réplication du MYXV au sein des J3T a été donc évaluée. Cette efficacité de la réplication a été comparée à celle observée pour les cellules de lapin RK13. Ces cellules, isolées à partir de l'espèce hôte du virus, sont connues pour être permissives au MYXV, et ce, quelle que soit la souche utilisée (Blanié *et al.*, 2010; Camus-Bouclainville *et al.*, 2004; Duteyrat *et al.*, 2006).

Nous avons donc infecté RK13 et J3T à 80-90% confluence à une MOI de 1. Nous avons ensuite prélevé le surnageant et lysé les cellules afin de récupérer l'ensemble des virus (virions immatures intracellulaires et formes matures libérées dans le surnageant) puis mesuré la quantité de génome viral présente au cours du temps par qPCR en amplifiant le gène M071 (Fig. 17). Ce gène appartient aux gènes dits « tardifs ». Autrement dit, l'augmentation de la quantité de copie génome est subordonnée à (i) l'entrée des virus au sein des cellules et (ii) la capacité de réplication virale jusqu'à des stades tardifs. De ce fait, si la quantité de copies génome augmente au cours du temps, cela veut dire que le virus est entré et que la réplication est possible. Par contre, si la quantité de copie génome n'augmente pas, il est difficile de savoir si le virus n'est pas entré au sein de la cellule ou si la réplication a été stoppée avant d'atteindre la réplication des gènes tardifs.

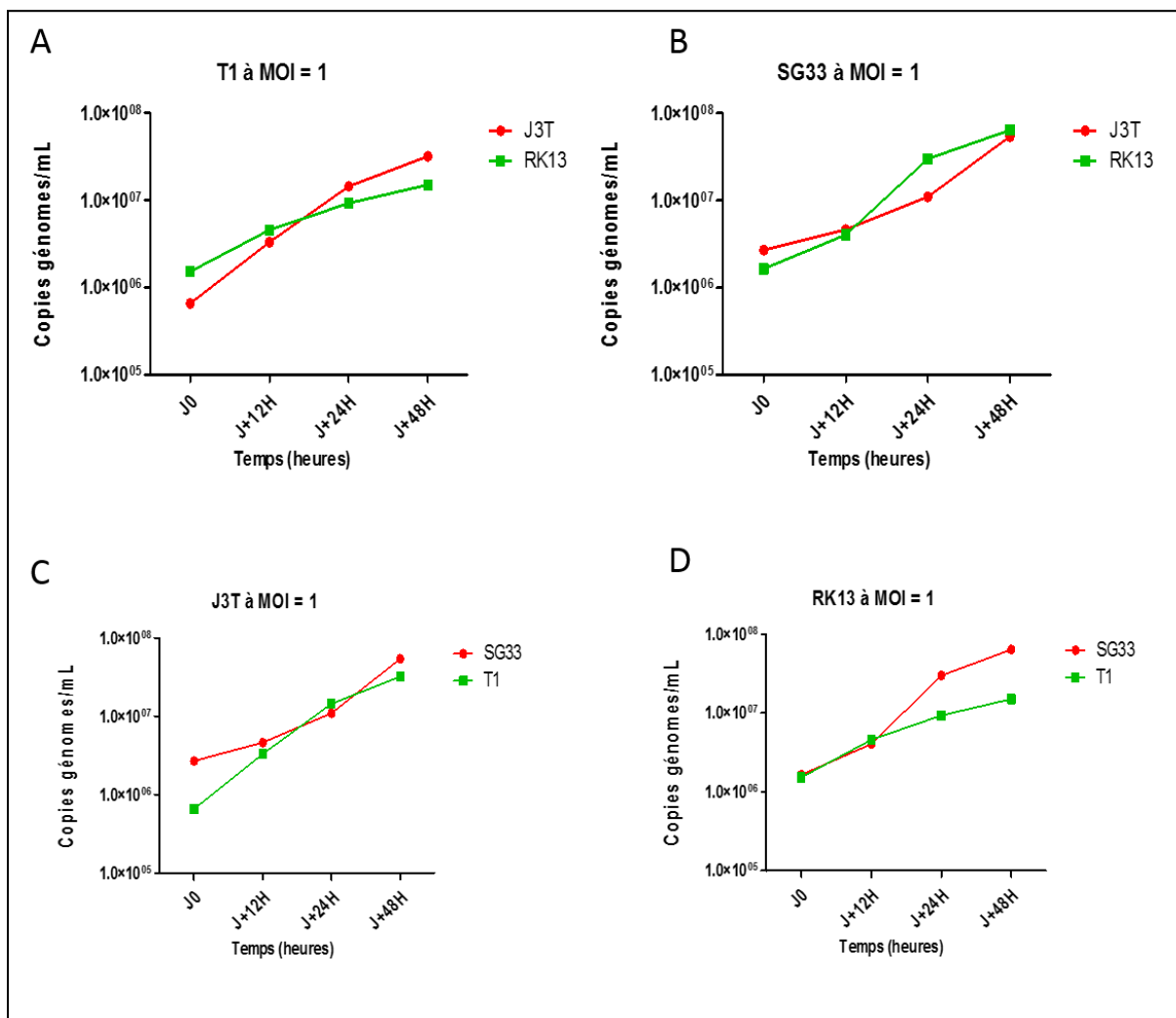
On remarque que, quel que soit la souche virale utilisée (SG33 ou T1), la vitesse de réplication du virus est voisine pour J3T et RK13 (Fig.17 A-B). Pour SG33 et T1, le virus est donc capable d'entrer au sein des cellules et la réplication du virus est possible.

En virologie, une cellule sensible est une cellule qui peut être infectée par un virus, autrement dit qui permet la pénétration du virus : l'étude de la quantité de copies génome présentes au sein des cellules à T0 nous renseigne donc sur la sensibilité des cellules au virus. A T0 pour J3T (Fig.17C) le nombre de copie génome de SG33 est supérieur à celui de T1 : sachant que la réplication n'a pas commencé, cela évoque alors soit une entrée du virus facilitée

pour SG33 (plus de virus entre dans les cellules), soit un nombre accru de cellules sensibles à SG33 par rapport à T1 (cette hypothèse considère alors la lignée J3T comme une lignée hétérogène). Par contre, après 48 heures, le nombre de copie génome de SG33 et T1 est voisin.

Pour la lignée RK13, la différence à T0 n'est pas présente: autrement dit, la capacité d'entrée du virus est similaire pour SG33 et T1 ou bien, on a le même nombre de cellules sensibles à SG33 qu'à T1. En revanche, le nombre de copie génome obtenu après 48 heures est supérieur pour SG33 par rapport à T1 (Fig 17-D), donc, sachant que le même nombre de virus est entré au sein des cellules, la multiplication de SG33 est donc plus rapide que T1. Ceci peut alors s'interpréter de différentes manières : soit la vitesse de réplication de SG33 est réellement supérieure à celle de T1 (la durée du cycle de réplication est inférieure), soit la quantité de virions fonctionnels produits est supérieure pour SG33. En effet, si les virions produits sont défectifs, ils ne sont pas capables d'infecter les cellules adjacentes et, par conséquent, la quantité de copie génome obtenue au cours du temps est inférieure. Les deux hypothèses présentées ne sont pas contradictoires : vitesse de réplication et production de virions fonctionnels peuvent donc être différents pour SG33 et T1.

Cette première évaluation de la capacité de réplication des virus montre que SG33 et T1 sont capables de se multiplier au sein de la lignée de GBM canin J3T avec une efficacité proche de celle observée sur RK13. La souche SG33 semble cependant supérieure puisque sa capacité d'entrée (J3T) et sa vitesse de réplication (RK13) est supérieure à celle de T1. Cependant, la multiplication de l'ADN viral n'est pas nécessairement à l'origine de la production de virions fonctionnels et donc infectieux. De plus, cette légère différence entre SG33 et T1 se retrouve-t-elle à des MOI différentes ?



**Figure 17:** Efficacité de la réplication du MYXV. Mesure par qPCR de la quantité de génome viral présente au cours du temps. A) compare cette quantité pour le virus T1 au sein des lignées cellulaires J3T et RK13, B) fait de même pour le virus SG33 et C) et D) compare l'efficacité de réplication des virus T1 et SG33 pour chaque lignée prise séparément.

### II.2.1.2. Influence de la MOI dans l'étude de la permissivité des J3T

Selon la quantité de virus utilisée, la réplication virale peut-être affectée. En effet Nakai *et al.* ont étudié le virus de la Rougeole et ont démontré qu'à des faibles MOI, les titres viraux obtenus après infection étaient supérieurs à ceux obtenus à des MOI plus fortes (Nakai *et al.*, 1969). Pour ce même virus, Scott et Chopin ont mesuré le titre viral obtenu avec des MOI allant de 0.001 à 10 et ont conclu qu'une MOI de 0.01 permettait d'atteindre des titres maximum (Scott and Chopin, 1982). Autrement dit, pour le virus de la rougeole, des MOI plus fortes ne sont pas nécessairement synonyme d'une production virale supérieure. Néanmoins, en fonction des types cellulaires, la MOI la plus forte permettait d'atteindre des titres viraux supérieurs (Udem, 1984). A notre connaissance, l'efficacité de la production virale de MYXV après

infection des cellules de gliomes à différentes MOI n'a pas été établie, or cette information est primordiale. En effet, dans le cadre d'une injection intratumorale, les concentrations virales et donc les MOI ne sont pas les mêmes selon la localisation tumorale considérée. Il semble logique que la MOI soit maximale autour du site d'injection et qu'elle diminue en allant vers la périphérie.

De plus, la possibilité d'une multiplication virale n'est pas synonyme de production de virus infectieux. Par exemple, la multiplication du VACV est possible au sein des cellules de carcinome félin mais les virions produits sont morphologiquement anormaux et non infectieux. (Parviainen *et al.*, 2015).

C'est donc pour ces multiples raisons que nous avons mesuré la réplication virale à deux MOI différentes (MOI = 0.5 et MOI = 3) à la fois par qPCR et par titrage sur RK13. Ce dernier nous permet donc de connaître la fonctionnalité du virus. En effet, le titre viral est déterminé selon le nombre de plages de lyse qu'il est capable de provoquer au sein d'un tapis de cellules permissives (RK13). Or, seuls des virus « fonctionnels » sont capables de produire ces plages de lyse.

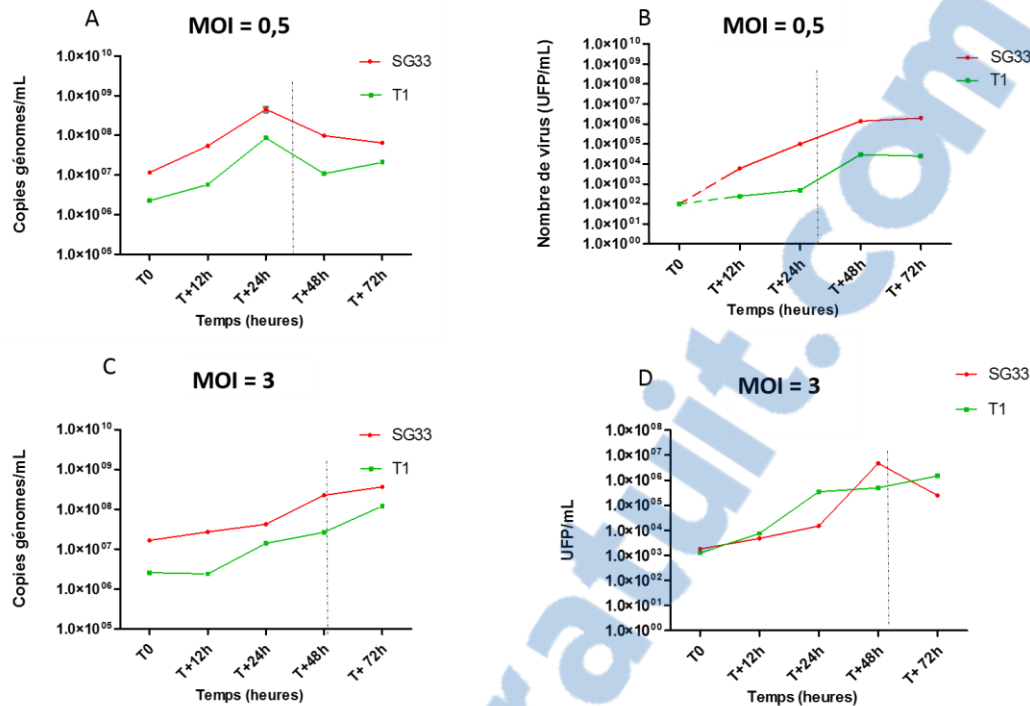
#### **a. J3T est permissive au MYXV**

On remarque que la quantité de virus augmente au cours du temps, quelle que soit la MOI ou la méthode de détection virale utilisée (Fig. 18). La quantité de virus est au moins multipliée par 10 entre le point T0 et le maximum de la courbe de cinétique (ce point correspond au titre maximum de virus obtenu juste avant le début de la mortalité cellulaire). Le nombre de copie génome maximum obtenu est alors de  $4,5 \cdot 10^8$  (SG33) et  $8,6 \cdot 10^7$  (T1) à MOI=0.5 et  $7,28 \cdot 10^8$  (SG33) et  $1,2 \cdot 10^8$  (T1) à MOI=3 (Fig. 18A-C).

Concernant le titrage en RK13, on obtient au maximum,  $1 \cdot 10^6$  UFP/mL (SG33) et  $1,25 \cdot 10^5$  UFP/mL (T1) à MOI=0.5 et  $4,75 \cdot 10^6$  (SG33) et  $1,5 \cdot 10^6$  (T1) à MOI=3 (Fig.18B-D).

Ceci montre donc que, pour les MOI utilisées, le MYXV est capable de se multiplier au sein des cellules de gliome canin. La quantité de virus augmentant au cours du temps d'au moins un log, la multiplication permet la formation de virions infectieux : les cellules sont donc permissives.





**Figure 18:** Cinétiques de multiplication de SG33 et T1 à différentes MOI.

Les cellules J3T à 70-80% confluence ont été cultivées dans DMEM 10% FBS pendant 24 heures puis infectées à différentes MOI (0.5 et 3) avec deux souches virales (SG33 et T1), lavées et congelées après 0h (juste après adsorption), 12h, 24h, 48h et 72h. Après 3 séries de congélation-décongélation permettant de lyser les cellules, la quantité de virus présent a été titrée selon 2 méthodes : qPCR et titrage sur RK13. Cette figure compare alors les cinétiques de multiplication selon le virus utilisé à MOI = 0.5, en qPCR (A) et en titrage sur RK13 (B) et à MOI = 3 (C) en qPCR et (D) en titrage RK13

----- représente le moment à partir duquel les J3T, infectées à MOI = 0.5 se décollent suite à leur confluence trop importante (A-B) ou celui à partir duquel un effet cytopathique massif est visible à MOI=3 pour le virus SG33(C-D). Ceci n'est pas observé pour le virus T1.

----- représente une incertitude dans la mesure du nombre de UFP/mL à T0. En effet, aucune plage de lyse n'a été observée à la dilution  $10^{-2}$ , autrement dit, nous savons que le titre viral de SG33 et T1 à T0 est au maximum de  $10^2$  UFP/mL

## b. Une cinétique modifiée par la mortalité cellulaire

Pour les deux souches virales à MOI=0.5 et pour SG33 uniquement à MOI=3, les cellules ne restent pas viables jusqu'à 72 heures. Ceci explique les résultats observés à la fin des courbes présentées sur la Figure 18.

A MOI=0.5, les cellules non infectées (contrôle négatif) et les cellules infectées meurent au même moment. Les J3T ayant une vitesse de croissance très rapide, le tapis reste intègre seulement pendant 24-48 heures. Ensuite, le tapis se décolle et les cellules meurent (Fig. 18 A-B) limitant ainsi la faculté de multiplication du virus et entraînant la destruction de l'ADN présent dans le milieu par les endonucléases libérées lors de la mort cellulaire. Ceci explique la diminution de l'ADN viral constaté sur la Figure 18A. Contrairement à l'ADN, les virus sont peu sensibles aux enzymes libérées lors de la lyse cellulaire. De ce fait, l'augmentation du

nombre d'UFP/mL après le décollement du tapis cellulaire, peut s'expliquer par l'infection des rares cellules encore viables par les particules virales présentes dans le milieu. Cependant, il est clair que la vitesse de multiplication virale est affectée par la mortalité cellulaire (Fig.18B) puisque la pente de la courbe d'UFP/mL en fonction du temps est supérieure avant le décollement du tapis cellulaire.

A MOI=3, un effet cytopathique majeur est observé avec SG33, notamment après 48 heures (Fig.18C-D) où près de 100% des cellules sont mortes. Les cellules sont détruites par le virus, leur densité est donc moindre, donc le décollement spontané du tapis cellulaire n'intervient pas. Macroscopiquement, on remarque un effet cytopathique de plus en plus marqué au cours du temps et, après 48 heures, seules quelques très rares cellules restent adhérentes et donc saines (Fig. 18 C-D). Ce phénomène sera détaillé ci-après. Ceci explique la stagnation de la production d'ADN viral (Fig. 18C) et la diminution du nombre d'UFP/mL après 48 heures pour SG33. Il est intéressant de remarquer que, malgré la mort des cellules, la quantité d'ADN viral ne diminue pas. Par conséquent, il est possible que les mécanismes de mort cellulaire à MOI=0.5 (décollement du tapis) et à MOI=3 (effet cytopathique du virus) soient différents. Les cellules infectées avec T1, quant à elles, ne présentent pas un effet cytopathique aussi marqué mais restent cependant viables pendant toute la durée de la cinétique (à la différence du contrôle). Ainsi, le nombre de copie génome et le nombre de d'UFP/mL augmentent progressivement au cours du temps (Fig. 18 C-D).

### **c. Une pénétration cellulaire facilitée pour SG33**

Sachant que la réplication virale n'a pas encore commencé (Fig.18), le nombre de copie génome mesuré à T0 reflète le nombre de virus étant entré dans les cellules pendant la période d'adsorption. En effet, cellules et virus sont en contact pendant 1 heure 30 minutes, puis l'inoculum viral est retiré et les cellules sont lavées. Autrement dit, la majorité des particules virales présentes dans le surnageant après l'adsorption sont retirées : il ne reste quasiment plus que les virus ayant pénétré dans les cellules et les virus résiduels à la surface cellulaire (en voie de pénétration cellulaire).

On constate que, pour une souche virale considérée, le nombre de copies génome viral à T0 à MOI=0.5 est très proche de celui à MOI = 3 (Fig. 19A). Cela peut s'expliquer par une saturation de l'entrée des virus au sein des cellules : l'augmentation de la MOI n'entraîne pas une augmentation proportionnelle de l'entrée de virus.

A T0, le nombre de copies génome de SG33 est significativement supérieur à celui de T1, à MOI=0.5 (t-test unilatéral  $p=0.03$ ) et à MOI=3 (t-test unilatéral  $p=0.007$ ) (Fig.19A). Ce

résultat peut alors évoquer une pénétration facilitée du virus SG33, comme cela avait été évoqué à MOI = 1 (Fig. 17C).

Par contre, si on considère le titrage en RK13, les nombres d'UFP/mL à T0 ne sont pas différents pour SG33 et T1 (Fig. 19B). Ceci peut s'expliquer de plusieurs manières : (1) le manque de sensibilité de la détection des UFP par rapport à la PCR quantitative, (2) l'infection ayant commencé depuis moins de 2 heures, de nombreux virus ont pu démarrer leur cycle de réplication et sont donc en cours de décapsulation et par conséquent non fonctionnels, les deux hypothèses n'étant pas exclusives. Il est donc pertinent de s'intéresser plus particulièrement à la mesure des copies génomes lorsqu'on considère la capacité d'un virus à pénétrer au sein d'une cellule. Pour sa multiplication dans le temps, par contre, les deux mesures sont complémentaires.

Cette supériorité de SG33 par rapport à T1 est conservée au fil du temps. En effet, les pentes des courbes du nombre de copies génomes ou de UFP/mL au cours du temps sont similaires pour T1 et SG33 (Fig.18A,B,C,D). On suppose alors que, pour la lignée J3T, dans la limite des MOI étudiées, le virus SG33 entre plus facilement au sein des cellules de gliomes canins et se multiplie ensuite à une vitesse équivalente à celle de T1.

Les différentes cinétiques de production virale au sein des J3T ont permis de conclure que le MYXV était capable de se multiplier au sein des cellules de gliomes canins J3T. De plus, un effet cytopathique a été observé macroscopiquement. Cette effet cytopathique doit alors être quantifié afin d'envisager l'utilisation du MYXV en tant que virus oncolytique. SG33 semble pénétrer dans les cellules plus facilement que T1 et l'effet cytopathique observé avec SG33 à MOI=3 semble nettement supérieur à celui observé avec T1.

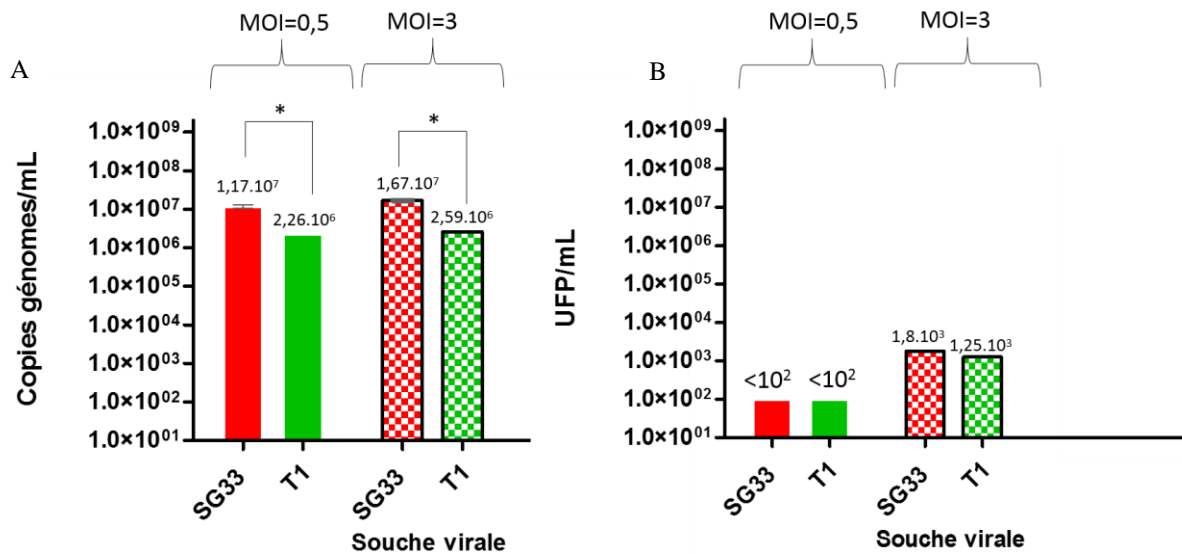


Figure 19: Une pénétration facilitée de SG33 par rapport à T.

Nombre de copies génomes du virus à T0 mesuré par qPCR (A) et nombre de particules virales infectieuses à T0 mesuré par titrage sur RK13 (B). Le titre en UFP/mL de SG33 et T1 n'a pas pu être déterminé compte tenu des conditions expérimentales. Les titres en UFP/mL déterminés pour SG33 et T1 à MOI=0.5 correspondent à l'absence de lecture de plaque de lyse à la dilution  $10^{-2}$  lors du titrage sur RK13.

### II.2.1.3. Le MYXV est cytotoxique pour les J3T

Afin de quantifier l'effet cytopathique des deux souches virales SG33 et T1, les J3T ont été cultivées 24 heures dans DMEM 10% SVF. Puis, à 60-70% confluence, les cellules ont été infectées à MOI=5 avec SG33, T1 ou non infectées (contrôle négatif). La viabilité cellulaire a ensuite été mesurée par MTS assay après 48 heures. La viabilité a été calculée comme le ratio de l'absorbance obtenue pour les cellules infectées sur l'absorbance des cellules non infectées (Fig. 20).

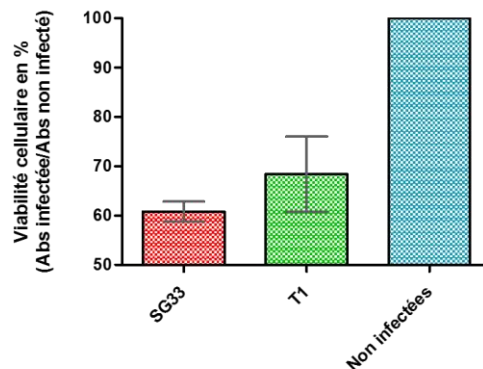


Figure 20: Viabilité des J3T suite à l'infection par MYXV. Après 24 heures de culture dans une plaque 96 puis avec du DMEM 10% SVF, les cellules ont été infectées avec SG33, T1 à MOI=5 ou non infectées et l'absorbance a été mesurée à 490 nm 48 heures plus tard. La viabilité a été calculée comme le ratio de l'absorbance obtenue pour les cellules infectées sur l'absorbance des cellules non infectées

Après 48 heures, l'absorbance des cellules infectées avec SG33 et T1 est significativement inférieure au contrôle négatif non infecté (SG33, p-value = 0.0256 ; T1, p-value = 0.02835, données non montrées). L'infection par le MYXV est donc cytotoxique. En effet, seulement 60-70% des cellules sont viables après 48 heures. L'origine de cette cytotoxicité (multiplication virale ou effet toxique) reste à élucider.

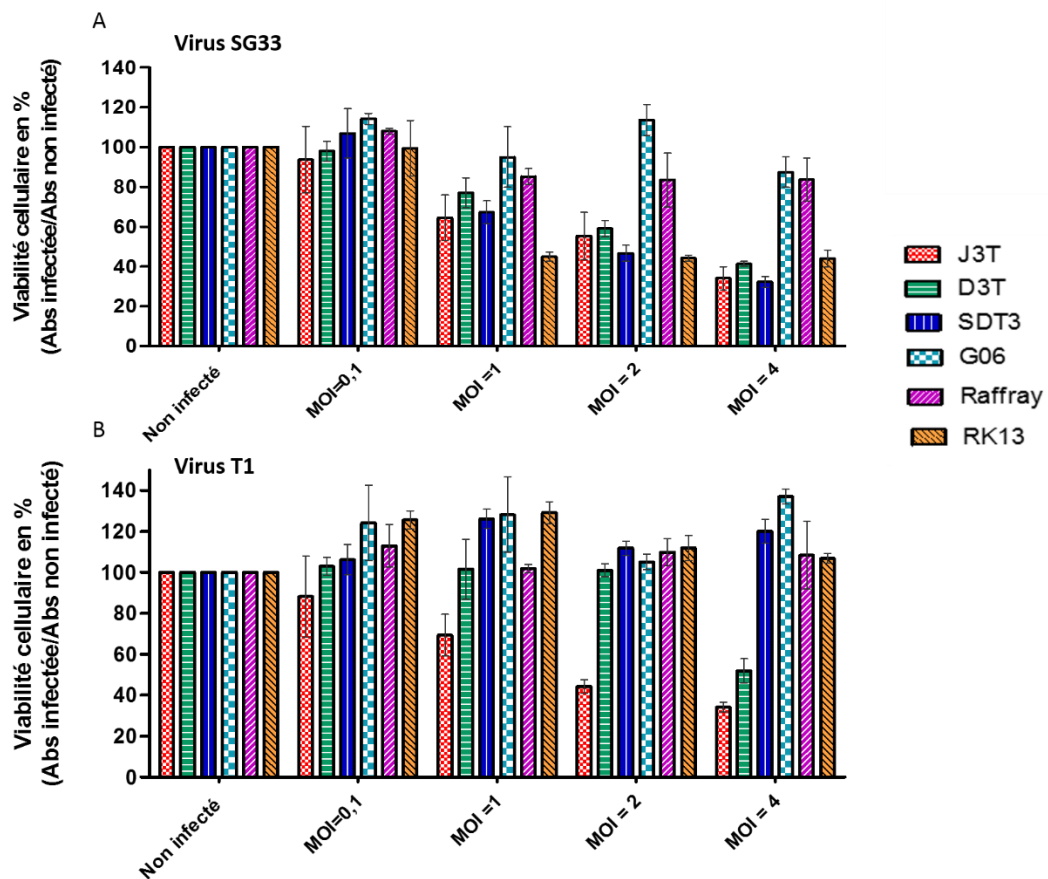
Cependant, aucune différence significative n'est visible entre SG33 et T1 (t-test bilatéral, p-value = 0.2268), bien que la tendance soit en faveur d'un effet supérieure de SG33. Par conséquent, malgré la légère différence observée quant à la pénétration virale au sein des J3T, le SG33 n'apparaît pas significativement plus cytopathique que le T1 à MOI=5, après 48 heures. Cependant, cette conclusion n'est valable que pour une MOI donnée, après un temps donné et pour un type cellulaire donné.

L'étude des J3T a permis de dégager plusieurs conclusions quant à l'utilisation du MYXV. Les cellules J3T semblent permissives au MYXV aux 3 MOI testées. La souche SG33 semble entrer plus facilement au sein des cellules (capacité supérieure ou nombre de cellule permissive supérieur). Enfin ces cellules sont sensibles au virus à de fortes MOI et il ne semble pas y avoir de différence significative entre SG33 et T1. Ces conclusions doivent être élargies à un plus grand nombre de cellules de gliome afin de confirmer l'intérêt du MYXV.

## **II.2.2 Cytotoxicité de SG33 et T1 envers d'autres lignées cellulaires de gliomes canins**

### **II.2.2.1. Une sensibilité différente en fonction des lignées**

On définit ici la sensibilité comme l'expression de la mortalité cellulaire après infection et non leur capacité à être infectées comme utilisé plus haut. Lun *et al.* ont testé plusieurs lignées cellulaires de gliome humain et ont montré que la cytotoxicité du MYXV était dépendante de la MOI et du type cellulaire (Lun *et al.*, 2005). Afin de confirmer ce résultat pour les lignées cellulaires de gliomes canins, plusieurs lignées canines ont été utilisées (J3T, D3T, SDT3, G06A, Raffray) et ont été comparées aux RK13 dont on connaît la sensibilité majeure au MYXV.



**Figure 21** : Sensibilité des différentes lignées cellulaires de gliomes canines et de RK13 aux deux souches de MYXV, SG33 (A) et T1 (B). Les cellules ( $20.10^3$  cellules) ont été cultivées 48 heures avec DMEM 10% SVF dans une plaque 96 puits, puis infectées avec SG33, T1 ou non infectées à différents MOI. Quarante-huit heures plus tard, un MTS assay a été réalisé : la viabilité est définie comme le ratio de l'absorbance des cellules infectées sur l'absorbance des cellules non infectées.

La mesure de la viabilité cellulaire à différents MOI pour les différentes lignées cellulaires utilisées permet de connaître la sensibilité de ces cellules aux deux souches de MYXV utilisées. On constate qu'à MOI=0,1, aucun effet significatif n'est observé après 48 heures que ce soit pour SG33 ou T1. A partir de MOI=1 pour SG33, la viabilité cellulaire diminue progressivement pour J3T, D3T et SDT3 pour atteindre seulement 30-40% à MOI=4. La sensibilité de ces lignées pour SG33 est alors voisine de celle des RK13 (Fig. 21A). Par contre, avec T1 seules les J3T, et à une moindre mesure des D3T sont affectées (Fig.21B). Ces deux lignées cellulaires sont même plus sensibles que les RK13 au MYXV T1. Il semble normal que J3T et D3T se comportent de façon similaire étant donné que la lignée D3T est issue des J3T (Cf. matériels et méthodes). Par contre, il est intéressant de noter que, pour T1, le seuil à partir duquel la viabilité de D3T diminue de façon marquée est supérieure à celui de J3T. En effet, alors qu'une MOI de 2 n'entraîne pas de diminution de la viabilité des D3T, une MOI de 4 entraîne une mortalité de 50% des cellules.

Il est intéressant aussi de constater que la lignée SDT3 est sensible à la souche SG33 à partir de MOI=1 mais pas à la souche T1.

A l'inverse, les lignées G06 et Raffray semblent beaucoup moins sensibles au virus SG33 (Fig. 21A). En effet à MOI=4 la viabilité de ces lignées est supérieure à 80%. De plus, ces deux lignées ne sont pas sensibles à T1 (Fig.20B).

Ces résultats, et notamment ceux de T1 avec D3T ou de SG33 avec SDT3 évoque la possibilité d'un seuil à partir duquel l'effet lytique du virus est mesurable sur les cellules étudiées.

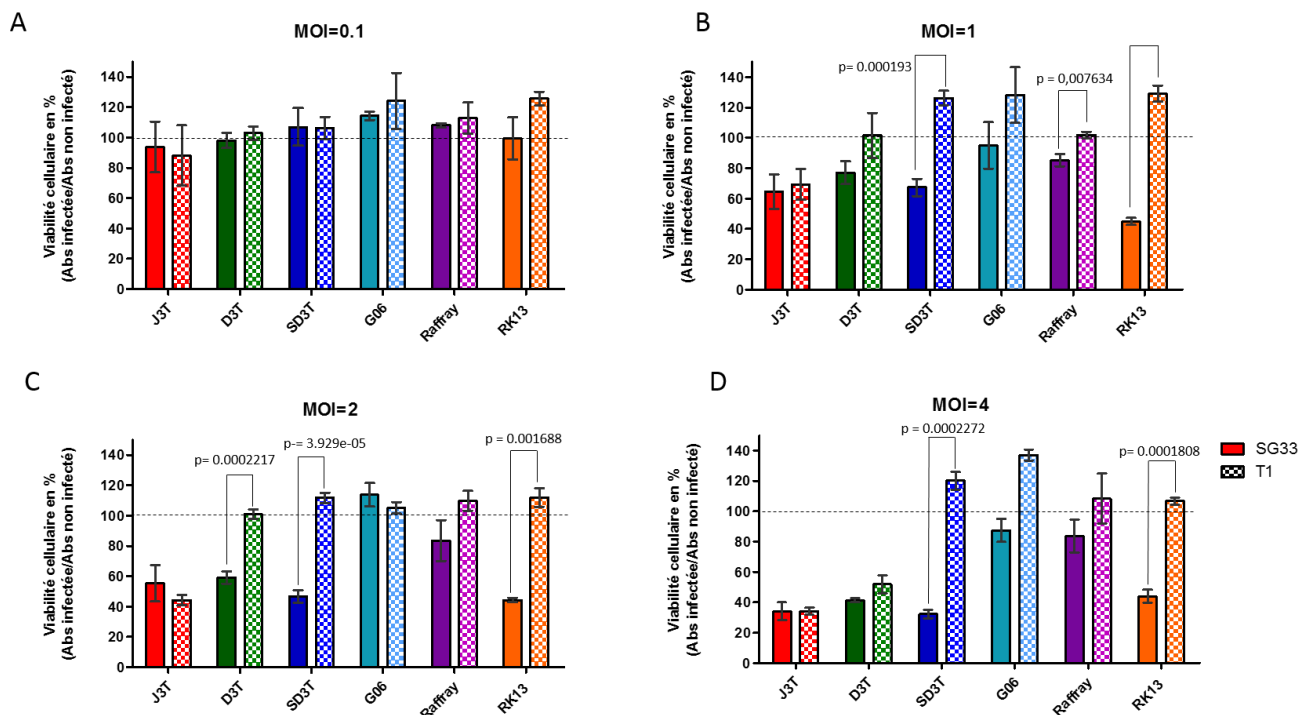
#### **II.2.2.2. SG33 est plus cytotoxique que T1**

Si on compare différemment la viabilité des cellules infectées avec SG33 et T1, on remarque que pour SDT3, SG33 entraîne une diminution de la viabilité significativement supérieure à T1 à partir de MOI=1 (Fig.22B,C,D). De même, on constate cette supériorité de SG33 pour D3T à MOI=2 (Fig.22C). Pour J3T, il n'y pas de différence significative entre les deux souches virales comme cela avait déjà été montré à MOI=5 (Fig.20). Par contre, la lignée G06 étant peu affectée par l'infection, il est normal que les différences entre les deux souches virales ne soient pas significatives.

De plus, il est intéressant de noter que le ratio abs(cellules infectées)/abs(cellules non infectées) augmente pour certaines lignées cellulaires suite à l'infection par le MYXV (notamment pour T1) (Fig. 22). Il semble cependant peu probable (bien que possible) que le virus stimule la multiplication cellulaire. Par conséquent, l'autre explication est une réduction artéfactuelle du tétraozolium (réactif utilisé par le MTS assay) par le virus lui-même ou bien par la cellule, en réponse à l'infection virale. De nombreuses interférences ont été décrites et peuvent être alors responsables de l'augmentation de l'absorbance des cellules infectées. Ce résultat surprenant sera discuté ultérieurement.

Ces résultats montrent alors bien que les réponses cellulaires au virus sont très dépendantes de la MOI ainsi que du type cellulaire considéré, ce qui renforce l'intérêt de tester différentes MOI pour chaque type cellulaire comme cela a été fait pour J3T.

Cependant, ces résultats sont vérifiés pour des MOI inférieures ou égales à 4 après seulement 48 heures. Dans l'optique de l'existence d'un seuil minimum d'infection, il est possible que ces cellules deviennent sensibles au virus à des MOI supérieures ou que des temps plus longs puissent permettre une action supérieure du virus.



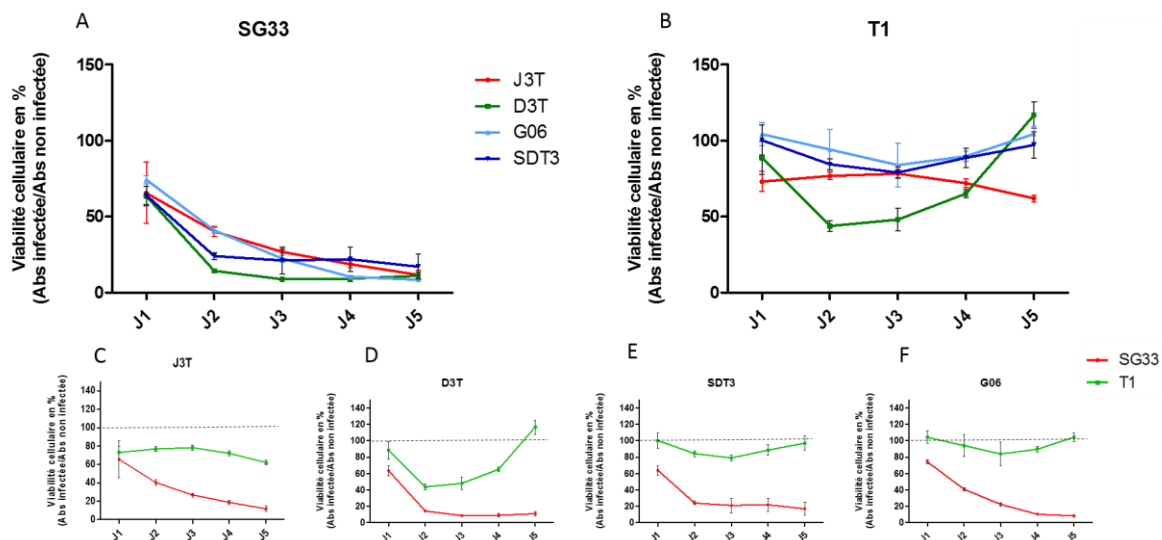
**Figure 22:** Comparaison des effets cytotoxiques des virus SG33 et T1 à différentes MOI (0.1, 1, 2, 4) pour différentes lignées cellulaires de gliomes canins (J3T, D3T, S3T, G06) et pour une lignée de rein de lapin (RK13)

*p* représente la *p*-value obtenue pour un test de Student bilatéral comparant la viabilité cellulaire après infection par SG33 ou T1, la *p*-value n'est notée que pour les points pour lesquels la viabilité est significativement différent selon le virus utilisé. Pour G06 à MOI=4, la différence est significative mais la différence n'a aucune signification biologique puisque la viabilité est largement supérieur à 100% évoquant une interférence avec le MTS assay.

### II.2.3 Cinétique de mortalité cellulaire au cours du temps

Afin de connaître les effets d'une MOI supérieure sur un temps plus long sur les cellules de gliomes canins, ces dernières ont été infectées à MOI=5 (une MOI supérieure n'a pas été expérimentalement possible) puis l'absorbance a été mesurée tous les jours pendant 5 jours. La quantité de cellules J3T présente au moment de l'infection était légèrement inférieure à celle utilisée précédemment (Fig.20) et peut expliquer les différences légères observées entre ces deux expériences pour la lignée J3T. Cependant, la comparaison entre les lignées reste valable.





**Figure 23:** Cinétique de la viabilité cellulaire en fonction du temps suite à l'infection par le MYXV, souche SG33 (A) ou T1 (B) pour 4 lignées cellulaires de gliomes canins (J3T, D3T, SDT3, G06) et comparaison des effets des virus pour les 4 lignées étudiées (C, D, E, F)

A MOI=5, une analyse statistique ANOVA permet de connaître quels facteurs influencent la viabilité cellulaire. On constate que les facteurs « lignée », « jour », « virus » ainsi que les interactions respectives sont significatifs.

Autrement dit, chaque lignée cellulaire répond différemment au virus en fonction du temps. En effet, pour les 4 lignées étudiées, la viabilité décroît rapidement après l'infection avec SG33 mais plus ou moins vite selon la lignée considérée (Fig. 23A). Après 48 heures, la viabilité a atteint son minimum pour D3T et SDT3 alors que la décroissance est plus progressive pour J3T et G06. Cette différence pourrait évoquer un effet lytique différent du virus : tandis qu'un effet toxique pourrait expliquer une diminution rapide de la viabilité pour D3T et SDT3, un effet cytopathique vraie (donc dépendant de la multiplication virale) pourrait expliquer la décroissance progressive observée pour J3T et G06. Cependant, après 5 jours, la viabilité des différentes lignées cellulaires n'est pas significativement différente (ANOVA 1 facteur  $p=0.219$ ). Par conséquent, quel que soit le mode de destruction des cellules, l'effet lytique du MYXV est conservé.

Pour T1, la viabilité est globalement supérieure à celle obtenue avec SG33 (Fig.23B) et reste voisine de 100% pour SDT3 et G06 (Fig.23E-F). On retrouve alors des résultats voisins de ceux obtenus à MOI=4. Ainsi, soit ces cellules ne sont pas sensibles au virus T1, soit la MOI seuil permettant de détruire ces cellules n'est pas atteinte. Les lignées J3T et D3T présentent, quant à elles, une diminution de la viabilité 24-48 heures post-infection qui augmente ensuite pour D3T : les cellules sont donc capables de se multiplier à nouveau à la suite de l'infection

virale (Fig.23.D), la production de virus fonctionnels est donc remise en cause pour cette lignée. Pour J3T, par contre, la viabilité diminue lentement et progressivement au cours du temps (Fig.23C) ; dans ce cas, par contre, la production de virions infectieux capables d'infecter, et donc détruire, les cellules adjacentes est très probable.

De plus, on constate de façon plus marquée qu'au MOI précédemment utilisée que SG33 est significativement plus cytotoxique que T1 (Fig.23C, D, E, F). En effet, après 5 jours, la viabilité des cellules infectées avec SG33 avoisine 10% alors qu'elle est environ de 100% pour D3T, G06 et SDT3 avec T1. Par contre, y compris à MOI=5, J3T semble plus sensible que les autres lignées à la souche T1 puisqu'après 5 jours, la viabilité n'est que de 60%. Il est aussi intéressant de noter que la lignée G06 dont la viabilité ne diminuait pas après une infection avec SG33 à MOI=4 semble sensible à cette souche virale à MOI=5 : le seuil à l'origine d'un effet lytique du virus est donc situé entre MOI=4 et MOI=5. Il est possible que ce seuil existe pour le virus T1 mais qu'il soit supérieur à 5.

L'étude de la mortalité cellulaire suite à une infection à forte MOI (5) est intéressante et pose de nombreuses questions quant à la capacité du MYXV à se multiplier au sein des cellules. Les suppositions émises grâce à ces résultats sont résumées dans le Tableau 10.

	SG33	T1
J3T	ECP et multiplication virale	ECP et multiplication virale
D3T	Effet toxique et virions abortifs	Effet toxique et virions abortifs
G06	ECP et multiplication virale	Peu sensible/peu permissive
SDT3	Effet toxique et virions abortifs	Peu sensible/peu permissive

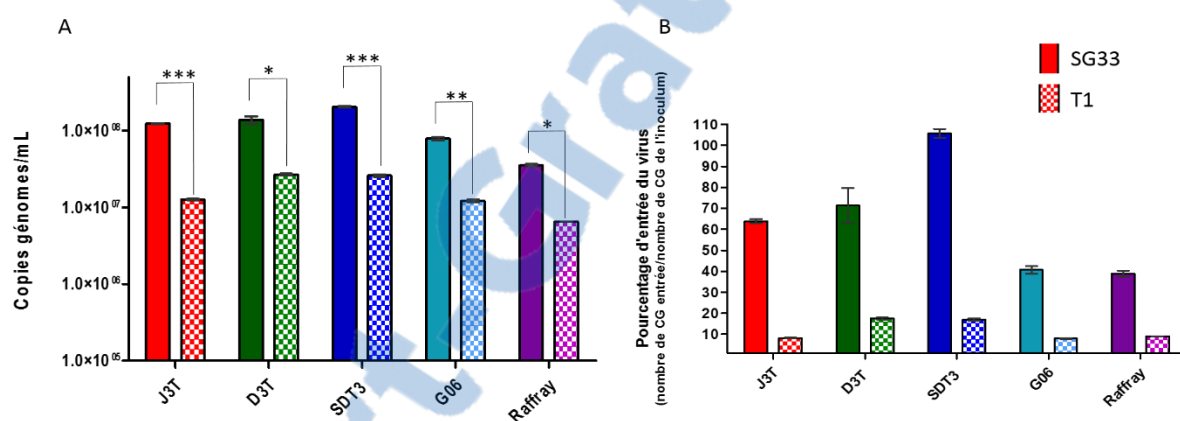
*Tableau 10: Mécanisme de lyse cellulaire et de multiplication virale évoqués par l'étude de la viabilité cellulaire au cours du temps*

Afin de confirmer ou d'infirmer ces hypothèses et de relier le mode de multiplication virale aux résultats de mortalité cellulaire, nous avons titré le MYXV suite à une infection à MOI=5 des lignées de gliome canin.

## II.2.4 Une permisivité différente en fonction des lignées cellulaires

### II.2.4.1. Une pénétration cellulaire facilitée pour SG33

Les résultats préliminaires sur J3T évoquaient la possibilité d'une pénétration cellulaire plus efficace de SG33 par rapport à T1 (Fig.19). Cependant, pour cette lignée, il ne semblait pas que cette propriété influence la sensibilité des cellules au virus (Fig.22). Cependant, il est important de connaître la capacité de pénétration des virus pour les autres lignées étudiées. Pour cela, nous avons infecté les différentes lignées de gliomes canins avec les deux souches virales à MOI=5 puis mesuré la quantité de virus présente après adsorption. La quantité de copie génome obtenue traduit donc le nombre de virus ayant réellement pénétré au sein des cellules.



**Figure 24:** Pénétration du MYXV (SG33 et T1) au sein des différentes lignées de gliome canin. A) représente la valeur absolue du nombre de copie génome ayant pénétré dans les cellules et B) représente le pourcentage de virus ayant pénétré les cellules à partir de l'inoculum.

Pour l'ensemble des lignées cellulaires de gliomes canins étudiées, la quantité de virus SG33 ayant pénétré les cellules est significativement plus importantes que celle de T1, que ce soit en valeur absolue (Fig.24A) ou en valeur relative par rapport à la quantité totale de virus dans l'inoculum (Fig. 24B). De plus, on constate que les lignées les moins sensibles au virus (G06 et Raffray) sont aussi celles qui présentent la plus faible pénétration virale.

Au sein de l'inoculum utilisé, on considère que le nombre de virus infectieux (et donc fonctionnel) est le même pour toutes les infections réalisées. Par conséquent, le pourcentage de copie génome mesuré à T0 est le reflet du nombre de virus ayant pénétré au sein des cellules pendant l'adsorption. Les différences observées entre les cellules traduisent donc de la capacité des cellules à permettre l'entrée du virus.

Pour les lignées décrites comme les plus sensibles au virus SG33 (J3T et D3T), 60-70% des virus de l'inoculum sont entrés. Pour les lignées les moins sensibles (G06 et Raffray), seulement 30-40% des virus sont entrés. Pour SDT3, qui présente une sensibilité intermédiaire,

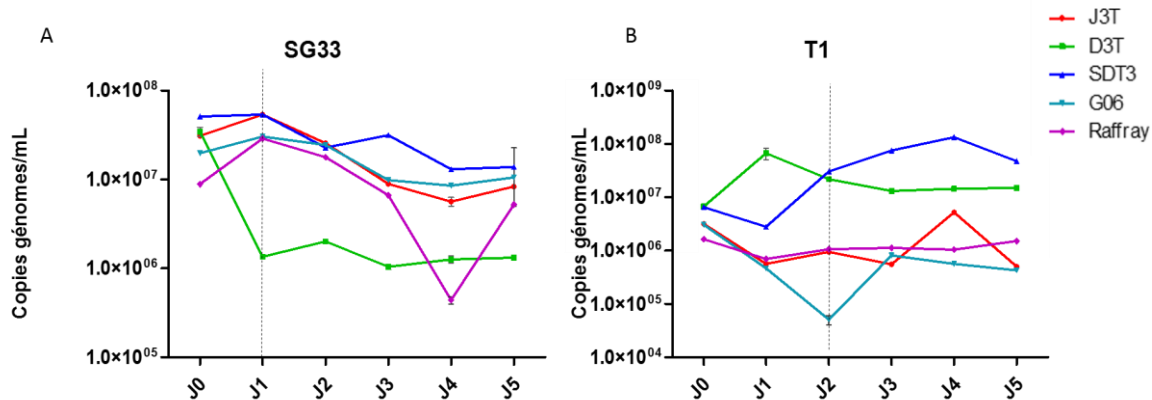
tous les virus de l'inoculum ont pénétré dans les cellules. Cependant, l'effet cytopathique observé n'est pas de 100% et certaines cellules sont encore viables 24 heures après infection. Par conséquent, pour cette lignée, deux hypothèses peuvent expliquer ces résultats, dans les deux cas, ces hypothèses se fondent sur une hétérogénéité de la population tumorale.

- La première hypothèse évoque une capacité différente des cellules à permettre l'entrée du virus SG33 : certaines cellules seraient particulièrement permissives au virus SG33 et permettraient alors l'entrée de nombreux virus (ceci a déjà été décrit pour le MYXV par Duteyrat *et al.*, 2006). Ces cellules, ayant permis l'entrée du virus, seraient détruites, pas les autres.
- L'autre hypothèse se fonde sur la sensibilité des cellules à l'infection virale. Si toutes les cellules ont intégré le virus, certaines sont détruites, d'autres non.

Pour le virus T1, l'entrée du virus est très faible. Cela serait alors une des raisons responsables de la très faible sensibilité des lignées cellulaires de gliome canin pour cette souche. Cependant, les lignées J3T et D3T sont relativement sensibles au virus T1. Sachant que l'entrée du virus est similaire pour toutes les lignées cellulaires, on peut alors conclure que les différences de cytotoxicité observées pour T1 ne sont pas dues à un différentiel de pénétration virale mais à une sensibilité particulière des cellules à cette souche virale.

#### **II.2.4.2. La capacité de réplication du MYXV est différente selon la souche et la lignée cellulaire considérée**

L'étude de la mortalité cellulaire au cours du temps (Fig.23) posait des questions quant à la capacité du virus à se multiplier au sein des cellules. Afin de vérifier la capacité du virus à se multiplier, nous avons mesuré la quantité de copies génomes présente au cours du temps, de J0 à J5.



**Figure 25:** Cinétique de production virale en nombre de copies génome au cours du temps pour les différentes lignées de gliomes canins avec A) pour SG33 et B) pour T1

Représente en A) le moment à partir duquel l'ensemble des lignées cellulaires présente une mortalité supérieur à 70-80%. Et en B) le moment à partir duquel le tapis cellulaire de J3T et D3T est complètement décollé (donc la plupart des cellules sont mortes)

Le point correspondant au nombre de copies génomes de SG33 après infection de la lignée Raffray à J4 semble correspondre à une valeur erratique associé à une erreur de manipulation plutôt qu'à une réelle diminution de la charge virale.

## Cas du virus SG33

Pour SG33, la quantité de copie génome diminue après 24 heures pour l'ensemble des lignées cellulaires. Cependant, pour J3T, SDT3, G06 et Raffray, le nombre de copie génome à 24 heures est supérieur à celui obtenu à T0 (Fig. 25A). Par conséquent, il est possible que le virus soit capable de se multiplier au sein de ces cellules mais que l'effet lytique soit tel que le virus n'ait plus de substrat après 24 heures. L'ADN viral serait ensuite dégradé, entraînant de ce fait une diminution progressive de la charge virale. L'autre hypothèse serait la production de virions abortifs qui ne seraient alors pas capables d'infecter les cellules adjacentes. Par conséquent, la quantité de copie génome augmenterait après la première infection mais, si ces virions formés n'étaient pas infectieux, ils ne pourraient pas se multiplier à nouveau. Cette seconde hypothèse est possible pour toutes les lignées sauf J3T où l'étude de la multiplication virale à de plus faibles MOI a clairement démontré la capacité du MYXV à produire des virions infectieux et fonctionnels.

Pour D3T, le raisonnement peut être le même mais plus rapide : la dégradation de l'ADN aurait alors commencé avant 24 heures (Fig.25A). Cette expérience doit donc être répétée en utilisant des temps plus précoces et/ou à des MOI plus faibles afin d'éviter l'altération des résultats par un effet cytopathique majeur du virus SG33 ou un décollement des cellules J3T et D3T.

## Cas du virus T1

Pour le virus T1, seule la lignée SDT3 permet une augmentation du nombre de copies virales au cours du temps. Pour toutes les autres, la quantité d'ADN viral diminue ou stagne (Fig.25B). Pour J3T et D3T, les courbes ne sont plus interprétables après 48 heures puisque les cellules, trop confluentes, meurent. Pour ces 4 lignées (J3T, D3T, G06, Raffray), l'absence d'augmentation du nombre de copies génome au cours du temps peut se traduire de différentes manières : (1) une absence totale de réplication virale (2) une réplication virale stoppée avant la transcription des gènes tardifs (3) une réplication virale possible mais à l'origine de virions défectifs qui ne peuvent pas infecter les cellules adjacentes et donc se multiplier. Pour J3T, contrairement à ce qui avait été observé à des MOI plus faibles, il est surprenant de constater qu'à une MOI plus forte, la quantité de copies génomes de T1 n'augmente pas au cours du temps. Ceci confirme donc bien que, selon la MOI utilisée, les cellules peuvent avoir un comportement différent.

Pour SDT3, après une diminution du nombre de copie génome à 24 heures, la charge virale augmente ensuite progressivement. Cependant, cette cellule n'est que très peu sensible au virus T1 (quelques plages de lyse observé qui sont en lien avec la diminution de viabilité de 15-20% objectivée dans la Fig.23). Cette lignée cellulaire permet donc la multiplication du virus sans être détruite. De plus, la présence d'une augmentation de la charge virale au cours du temps traduit la production de virions fonctionnels. Quelques cellules sont donc très certainement lysées et permettent la libération des virions produits qui sont ensuite capables d'infecter les cellules adjacentes. Il est donc possible que des temps plus longs permettent de mettre en évidence une cytotoxicité de T1 pour la lignée SDT3. Le concept de seuil minimal permettant une activité lytique du virus serait donc confirmé ici, y compris pour le virus T1. Ce seuil serait donc beaucoup plus élevé pour SDT3 que pour J3T et D3T.

Il faut cependant comprendre que ces conclusions sont envisagées à MOI=5 et ne sont peut-être pas vraies pour des MOI supérieures ou inférieures.

Mesurer la quantité de copies génomes au cours du temps n'a permis que partiellement de répondre aux questions posées précédemment (Tableau 11).

	<b>SG33</b>		<b>T1</b>	
	<b>Hypothèses soulevées lors de l'étude de la mortalité cellulaire</b>	<b>Conclusion de l'étude de la réplication virale au cours du temps</b>	<b>Hypothèses soulevées lors de l'étude de la mortalité cellulaire</b>	<b>Conclusion de l'étude de la réplication virale au cours du temps</b>
J3T	ECP et multiplication virale	Possible mais non confirmé	ECP et multiplication virale	Peu probable à MOI=5
D3T	Effet toxique et virions abortifs	Possible mais non confirmé	Effet toxique et virions abortifs	Peu probable à MOI=5
G06	Effet toxique et virions abortifs	Possible mais non confirmé	Peu sensible/peu permissive	Possible
SDT3	ECP et multiplication virale	Possible mais non confirmé	Peu sensible/peu permissive	Permissive mais peu sensible

*Tableau 11: Confrontation des hypothèses précédemment énoncées avec la cinétique de réplication virale au cours du temps*

Pour SG33, il semble que l'effet lytique soit tel que le virus ne soit pas capable de se multiplier après 24 heures. En effet, la majorité des cellules étant détruite, le virus ne dispose pas d'assez de substrat pour se multiplier correctement. Il est intéressant de noter que cet effet cytopathique est massif après 24 heures pour les 6 lignées cellulaires étudiées. Or, à MOI=4, Raffray et G06 étaient peu sensibles au virus SG33. Le concept de seuil permettant la lyse cellulaire semble donc pertinent à la vue de ces résultats.

Pour T1, il semble qu'à cette MOI, le virus ne soit pas capable de se multiplier pour la plupart des cellules. Pour J3T et D3T il est difficile d'interpréter la multiplication de T1 car après 48 heures, la plupart des cellules sont mortes à cause de la confluence supramaximale observée. Par contre, pour G06 et Raffray, l'absence de multiplication du génome viral associée à une absence d'effet lytique du virus tend à confirmer l'absence de permissivité. Pour SDT3, T1 est capable de se multiplier mais n'entraîne pas d'effet lytique massif.

Les résultats présentés sur les différentes lignées de gliomes canins permettent de séparer les cellules en 3 groupes résumés sur le Tableau 12.

	Sensibilité		Permissivité		Groupe
	SG33	T1	SG33	T1	
J3T	++	++	++	++ (- si MOI forte)	1
D3T	++	++	?	?	
SDT3	++	-	?	+	2
G06	+/-	-	?	- (à MOI=5)	3
Raffray	+/-	-	?	- (à MOI=5)	

*Tableau 12: Séparation des 5 lignées cellulaires en 3 groupes distincts en fonction de leur sensibilité et de leur permissivité supposée au MYXV. Ici, la sensibilité est définie comme l'expression de la mortalité à la suite de l'infection virale.*

Sur ce tableau 12, on constate que la permissivité des cellules reste, pour la plupart, hypothétique. Il est possible que l'utilisation de forte MOI empêche la réalisation d'un cycle viral normal comme cela est évoqué pour la lignée J3T. Des expériences supplémentaires à faibles MOI sont donc nécessaires pour savoir si ces cellules sont permissives ou non au MYXV.

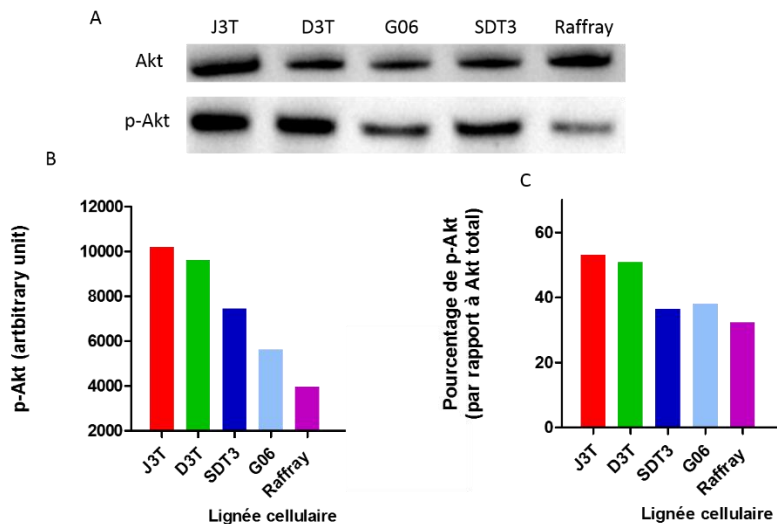
Les différences observées entre les lignées cellulaires ne semblent pas complètement expliquées par la capacité de pénétration du virus au sein des cellules (Fig.24). En effet, le virus T1 pénètre de façon équivalente au sein des 6 lignées cellulaires mais les conséquences sont très différentes. Pour SG33, par contre, la capacité de pénétration semble cruciale. D'autres caractéristiques sont donc responsables des différences observées entre les cellules. Les niveaux de phosphorylation d'Akt peuvent avoir un rôle à jouer.

### **II.2.5 Le niveau d'Akt phosphorylé semble impliqué dans la sensibilité et la permissivité au MYXV**

Plusieurs auteurs ont déjà montré que la sensibilité et la permissivité des cellules au MYXV était reliée au niveau d'Akt phosphorylé (p-Akt) (Correa *et al.*, 2012; Lun *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006). Wang *et al.* ont alors différencié 3 types de cellules tumorales : les cellules permissives, semi-permissives et non permissives selon les niveaux d'Akt phosphorylé (Wang *et al.*, 2006). De plus, la protéine virale M-T5 serait capable d'activer Akt et de permettre une infection productive (Werden and McFadden, 2008). Afin de vérifier ces résultats sur les



lignées cellulaires de gliomes canins, nous avons mesuré la quantité d'Akt phosphorylé basal des cellules étudiées. Pour cela les cellules ont été cultivées jusqu'à 80-90% confluence dans du DMEM 10% SVF et un Western Blot nous a permis d'obtenir une mesure semi-quantitative de p-Akt.



**Figure 26:** Comparaison des différents niveaux de p-Akt pour les différentes lignées de gliome canin étudiées. Après 48 heures de culture dans du DMEM 10% SVF, les protéines cellulaires ont été extraites et un Western blot a été réalisé sur des quantités égales de protéines. A) représente les résultats du Western blot B) et C) sont le résultat de l'évaluation semi-quantitative issu de A), avec B) la quantité totale d'Akt et C) le pourcentage de p-Akt par rapport à Akt total

On remarque que les niveaux de p-Akt sont différents selon la lignée cellulaire considérée (Fig. 24A). Même si ces résultats restent semi-quantitatif, on constate que les niveaux de p-Akt sont supérieurs (valeur absolue ou par rapport à Akt total) (Fig. 24B-C) pour les lignées J3T et D3T. Ceci semble corrélé à la plus grande sensibilité au MYXV (T1 et SG33) démontrée plus haut (Fig. 21). La lignée SDT3, quant à elle, est sensible au virus SG33 mais pas au T1 (Fig.21) et présente un niveau intermédiaire de p-Akt. Les lignées G06 et Raffray présentent les niveaux de p-Akt les plus bas (Fig.24B) des 4 lignées étudiées, et sont aussi très peu voire pas sensibles au MYXV (Fig. 21).

Les niveaux de p-Akt observés (Fig. 26B) semblent correspondre aux 3 types de lignées cellulaires étudiées. Par conséquent, la phosphorylation d'Akt semble impliquée dans la permissivité et la sensibilité des cellules au MYXV. Par contre, les quantités relatives (Fig.26C) de p-akt par rapport à Akt total ne permettent pas de différencier 3 populations différentes.

De plus, il est possible de supposer que la dépendance du MYXV pour Akt phosphorylé est différente selon la souche virale considérée : le seuil de p-Akt permettant une infection lytique serait plus bas pour SG33 que pour T1.

### II.3. Discussion

Le virus myxomateux est étudié en tant que virus oncolytique pour de nombreux cancers. En effet, plusieurs auteurs ont montré une activité lytique du virus envers des lignées cellulaires de tumeurs pancréatiques (Correa *et al.*, 2012), de carcinome transitionnel de la vessie (Weng *et al.*, 2014), de mélanome (Doty *et al.*, 2013), de gliomes (Lun *et al.*, 2010; Zemp *et al.*, 2013a) ou encore de leucémies (Madlambayan *et al.*, 2012). Le plus souvent, de 24 à 72 heures après infection, la viabilité des cellules était diminuée par l'infection par le MYXV (Madlambayan *et al.*, 2012). De plus, la plupart de ces cellules sont permissives au MYXV et permettent ainsi une multiplication virale et donc une auto-amplification de la réponse anti-tumorale.

Parmi ces cancers, les gliomes et notamment les GBM représentent un enjeu particulier. En effet, malgré les progrès de la chirurgie, de la radiothérapie et de la chimiothérapie, la médiane de survie des patients atteints de GBM n'a pas beaucoup évolué depuis 30 ans : en effet seulement 5% des patients survivent plus de 5 ans (Karsy *et al.*, 2015). On comprend alors l'intérêt majeur de la virothérapie anticancéreuse pour ces cancers contre lesquels les thérapies conventionnelles ne sont pas suffisantes. Le MYXV est un des virus étudiés en tant qu'agent thérapeutique des gliomes à l'image des herpes virus, adenovirus, des réovirus ou du virus de la maladie de Newcastle. De nombreuses études précliniques ont démontré l'intérêt du virus myxomateux dans le traitement des gliomes en utilisant des modèles rongeurs notamment (Lun *et al.*, 2005; Ogbomo *et al.*, 2013; Zemp *et al.*, 2013b, 2014). Ces études précliniques sont très prometteuses mais peuvent s'avérer décevantes comme cela a été décrit pour les herpesvirus ou les adenovirus (Harrow *et al.*, 2004; Markert *et al.*, 2009, 2014; Papanastassiou *et al.*, 2002; Chiocca *et al.*, 2004). Un des problèmes de la recherche en virothérapie oncolytique réside donc dans la congruence entre les études précliniques utilisant les modèles rongeurs et les essais cliniques. Par conséquent, afin d'améliorer la pertinence de la recherche préclinique, un nouveau modèle animal est nécessaire.

Le modèle chien semble très adapté à l'étude du gliome, tant par la nature spontanée des tumeurs, que par la ressemblance des gliomes canins avec leurs équivalents humains aussi bien au niveau des symptômes observés, que d'un point de vue histologique et moléculaire (Boudreau *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2013b; Stoica *et al.*, 2004).

Dans ce projet, nous avons alors tenté de montrer que le modèle canin pouvait être adapté à l'étude de l'utilisation du MYXV dans le traitement des gliomes. Nous nous sommes intéressés à l'aspect *in vitro*, indispensable avant d'envisager l'infection par le MYXV de chiens

atteints de gliomes. De plus, l'innocuité du virus étant un enjeu majeur dans le cadre de la virothérapie oncolytique, nous avons comparé les effets d'une souche de terrain (T1) avec ceux d'une souche atténuée, vaccinale (SG33).

Nous avons tout d'abord étudié la lignée J3T qui est une lignée d'astrocytome anaplasique canine très utilisée dans les études sur les gliomes. Nous avons alors démontré que les deux souches de MYXV étaient capables de pénétrer et de se multiplier au sein des J3T et ce, quelle que soit la MOI utilisée (0.5, 1 et 3). Nous avons aussi montré que cette lignée était sensible au MYXV, autrement dit, l'infection par le MYXV est capable de détruire les cellules de gliomes canins. Afin d'étendre ces conclusions à d'autres gliomes, nous avons utilisé plusieurs lignées cellulaires de gliomes malins canins. Plusieurs conclusions ont émergé de l'étude de ces lignées de gliomes canins.

### **La souche SG33 est supérieure à la souche T1**

Alors que seules les lignées J3T et D3T sont sensibles au virus T1, toutes le sont au SG33 à partir de MOI=5. De plus la quantité de virus SG33 présent après adsorption est supérieure au virus T1. Si on considère la population cellulaire de chaque lignée comme homogène, ce résultat impliquerait que la capacité du virus SG33 à pénétrer au sein des cellules est supérieure à celle du T1. Par contre, si les populations ne sont pas homogènes, il est envisageable que le nombre de cellules permettant l'entrée de SG33 soit supérieur à celui permettant l'entrée de T1. Une population cellulaire hétérogène est très probable : en effet Inoue *et al.* ont mis en évidence 2 profils d'infiltration différents après xélogreffe orthotopique de cellules J3T au sein du cerveau des rongeurs ; ces résultats semblent évoquer une certaine hétérogénéité de la population de J3T (Inoue *et al.*, 2012). De plus, après infection, une partie des cellules restent viables (les cellules non infectées ?) alors que la plupart sont détruites (les cellules infectées ?). L'observation en temps réel de la phase d'adsorption/pénétration grâce à l'utilisation d'un virus fluorescent pourrait permettre de répondre à cette question.

De plus, il semble que le virus T1 ne soit pas capable de se multiplier correctement au sein des lignées DT3, G06 et Raffray. Seules les lignées J3T et SDT3 semblent permettre la multiplication de cette souche de MYXV.

La souche SG33 est donc supérieure à la souche T1 : elle pénètre plus facilement au sein des cellules de gliomes, elle se multiplie a priori plus facilement et entraîne une mortalité supérieure. La comparaison entre la souche sauvage et la souche SG33 peut permettre d'apporter des réponses à ces différences observées.

La souche SG33 présente une délétion du côté droit du génome par rapport au MYXV sauvage (Camus-Bouclainville *et al.*, 2011). Au sein de cette délétion se trouve de nombreux facteurs de virulence. En effet, les gènes M151R, M152, M153, M154, M002L-M008L ont été délétés par rapport au virus sauvage. De plus, une fusion des ORF (Open Reading Frame) de M151R (SERP2) et M001L (codant pour la protéine MT1) ainsi que des mutations non-sens de M011L et M077L ont été rapporté. La fusion des protéines MT1 et SERP2 prive a priori les deux protéines de leur fonction. Ces délétions ont permis de diminuer fortement la virulence du MYXV, si bien que la souche SG33 est utilisée en tant que vaccin de la myxomatose en France et en Europe. Aucun signe de virulence n'a jamais été rapporté pour cette souche de MYXV, ce qui tend à prouver que l'atténuation du virus est stable (Camus-Bouclainville *et al.*, 2011). La supériorité de la souche SG33 par rapport à la souche T1 a déjà été évoquée par M.Gretillat en 2009 (Gretillat, 2009). En effet, il avait alors été démontré que la capacité oncolytique et répliquative du virus SG33 était supérieure à T1 pour différentes lignées cellulaires d'adénocarcinomes pancréatiques, ovariens et de cancers colorectaux humains (Gretillat, 2009).

Aucune étude ne s'était jusque-là intéressée à l'intérêt de la souche SG33 en tant que virus oncolytique contre les gliomes. Cependant, plusieurs études ont évoqué l'importance de certaines délétions dans le potentiel oncolytique du MYXV. En effet Barrett *et al.* ont montré que selon le facteur de virulence délété, la capacité des MYXV recombinants à se multiplier et à détruire les cellules de gliome humain était différente. Alors que des délétions des gènes codant pour les protéines T2, T4 ou T5 entraînaient une moindre efficacité, les délétions des gènes M063 et M135 entraînaient une répliquative plus efficace et surtout une activité lytique supérieure par rapport au virus sauvage (Barrett *et al.*, 2007b). De même Urbasic *et al.* ont montré que le MYXV présentant une délétion du gène M151R codant pour la protéine anti-apoptotique SERP2 entraînait une lyse plus importante de la lignée de gliome humain U118. Ce résultat était aussi valable pour des lignées cancéreuses canines (Urbasic *et al.*, 2012). Ces études montrent donc que des délétions ciblées de gène codant pour des facteurs de virulence précis permettent d'augmenter le potentiel oncolytique du MYXV envers les cellules de gliomes.

Les délétions de SG33 semblent donc en accord avec ces résultats. En effet, SG33 présente une délétion du gène codant pour SERP2 : cette délétion peut participer à sa supériorité observée sur les cellules de gliomes canins. A l'image de la protéine SERP2, la protéine anti-apoptotique M11L (Douglas *et al.*, 2007) est absente au sein de SG33. Ainsi, l'absence de ces protéines anti-apoptotiques semble bénéfique au potentiel oncolytique du MYXV. Il est alors

possible que ces protéines virales, lorsqu'elles sont présentes, limitent l'apoptose des cellules cancéreuses ; leur absence pour SG33 favoriserait alors l'effet lytique du virus. Cette hypothèse a déjà été proposée lors de l'utilisation du MYXV dans le traitement des carcinomes félines (MacNeill *et al.*, 2012). Cependant, la délétion de gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques n'est pas toujours associée à un potentiel oncolytique augmenté. En effet, les MYXV KO pour les gènes anti-apoptotiques MT2, MT4 ou MT5 n'ont pas de potentiel oncolytique supérieur (Barrett *et al.*, 2007b). Chez le lapin, la protéine virale M156R inhibe la voie PKR et diminue de ce fait la réponse antivirale, or cette voie est souvent diminuée au sein des cellules tumorales : la délétion de M156R semble donc peu intéressante pour expliquer la supériorité de SG33. SG33 présente aussi plusieurs délétions ou perte de fonction de facteurs de virulence codant pour des protéines capables d'inhiber la réponse inflammatoire (MT1, SERP3, MV-LAP) : l'étude de l'effet de ces délétions semble plus pertinente *in vivo* qu'*in vitro* et des essais sur chiens atteints de gliomes devraient permettre d'investiguer le rôle de ces délétions. De plus, le rôle de certaines protéines absentes de la souche SG33 n'a pas encore été élucidé (M001-M008, M077L) : ces protéines pourraient donc avoir une importance non négligeable dans la supériorité oncolytique de SG33 par rapport à T1. De plus, l'étude d'un virus où des multiples délétions sont présentes ne permet pas de conclure quant à l'importance individuelle de chacun des gènes délétés. Des effets additifs, synergiques ou opposés de ces multiples délétions pourraient entrer en jeu et doivent expliquer la supériorité de SG33. Il est cependant possible que certaines délétions soient plus importantes que d'autres : isoler ces délétions pourraient permettre de créer un virus plus efficace que SG33 mais en préservant son innocuité.

De plus, l'obtention de la souche SG33 a été réalisée après de nombreux passages sur cellules de reins de lapin. Par conséquent, ce virus est « habitué » aux conditions de laboratoire, très éloignées des conditions de terrain dans lesquelles a évolué la souche T1. Cette distinction peut aussi contribuer aux différences observées entre les deux souches virales.

Nous avons mis en évidence que l'entrée de la souche SG33 était globalement supérieure à celle du virus T1. Par conséquent, il est possible que des mutations ou des délétions présentes au sein de la souche SG33 soit à l'origine de cette capacité. Cette facilité de pénétration virale au sein des cellules tumorales est très recherchée en virothérapie oncolytique. De nombreux auteurs ont tenté d'augmenter cette capacité pour les HHV1, les adenovirus et les *Paramyxoviridae* (Miest and Cattaneo, 2014). Plus que la découverte d'un virus oncolytique, la comparaison entre les souches SG33 et T1 pourrait ensuite permettre de comprendre les mécanismes d'entrée du MYXV au sein des cellules.

Même si les mécanismes moléculaires impliqués dans la supériorité de SG33 par rapport à T1 ne sont pas clairement élucidés, l'utilisation de SG33 en tant que virus oncolytique semble préférable. En effet, cette souche vaccinale atténuée est a priori plus inoffensive que la souche sauvage et répond donc au besoin d'innocuité des virus oncolytiques.

### **Des réponses différentes en fonction des lignées étudiées**

A l'image de l'étude de Barrett *et al.* (Barrett *et al.*, 2007b) qui s'intéressait à différentes lignées cellulaires de gliomes humains, l'étude des différentes lignées de gliomes canins a permis de dégager 3 types de lignées cellulaires. Le premier type (les lignées J3T et D3T) regroupe des lignées sensibles aux deux souches de MYXV même à faible MOI. Le deuxième type concerne les lignées Raffray et G06 qui sont peu sensibles aux deux souches de MYXV utilisées. Cependant, de plus fortes MOI de SG33 semblent capable de lyser ces lignées. Le troisième type concerne la lignée SDT3 qui apparaît sensible au virus SG33 mais très peu au virus T1. Or, les caractéristiques histologiques de ces lignées sont différentes. Il est très intéressant de noter que les lignées G06 et Raffray comportent toute deux une composante oligodendrogliale (oligodendrogliome pour Raffray, GBM avec composante oligodendrogliale pour G06), et sont les moins sensibles au MYXV. La lignée D3T est une lignée dérivée de la lignée J3T et il semble donc normal que ces cellules répondent de façon similaire. La lignée SDT3 est un glioblastome « classique » et présente une sensibilité intermédiaire. Il serait alors intéressant de confirmer le manque de sensibilité des gliomes avec une composante oligodendrogliale en utilisant un nombre plus important d'échantillons.

Les niveaux de phosphorylation de la protéine Akt semblent jouer un rôle majeur dans la sensibilité des cellules au MYXV. En effet, l'évaluation semi-quantitative de p-Akt permet de distinguer 3 populations qui représentent les 3 types cellulaires évoqués plus haut. Wang *et al.* ont aussi défini 3 types de cellules en fonction des niveaux de p-Akt et de la permissivité des cellules au MYXV (Wang *et al.*, 2006) : le type I présente un haut niveau de p-Akt, le type II un niveau intermédiaire et Akt n'est pas phosphorylé pour le type III. Dans notre étude, il semble qu'on ne retrouve pas de type III (les lignées les moins sensibles, G06 et Raffray, présentent un niveau intermédiaire de p-Akt). J3T et D3T pourraient appartenir au type I selon Wang, SDT3, G06 et Raffray appartiendraient alors au type II. Cependant, il semble qu'au sein d'un même type cellulaire défini par le niveau de p-Akt, les comportements puissent être différents : SDT3 semble en effet très différente de G06 et Raffray. Il est donc possible que des sous-groupes existent au sein de la classification en 3 types établis par Wang. Cela évoque alors

l'implication d'autres mécanismes (hormis la phosphorylation d'Akt) dans la sensibilité des cellules au MYXV.

Les différences observées pour les 6 lignées peuvent être reliées au type histologique ou aux niveaux de p-Akt, cependant les mécanismes à l'origine de ces différences restent encore obscures. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées. Tout d'abord, les différences pourraient être expliquées par la capacité de pénétration du virus. En effet, notre étude a montré que la capacité de pénétration du virus était différente en fonction des lignées considérées. Or comme le montrent Yoon *et al.* avec un adenovirus (Yoon *et al.*, 2015), optimiser l'entrée d'un virus oncolytique entraîne une augmentation de son effet lytique mais aussi de sa multiplication au sein des cellules cancéreuses. En effet, les lignées les moins sensibles à la souche SG33 (G06 et Raffray) sont aussi celles qui limitent le plus l'entrée du virus. Cependant, bien que 100% de l'inoculum de SG33 pénètre au sein de SDT3, la mortalité observée n'est pas significativement supérieure à celle obtenue avec les lignées J3T et D3T. De plus, la souche T1 n'entre que très faiblement au sein des cellules, et pourtant, certaines cellules sont sensibles et d'autres pas. Cette hypothèse fondée sur un différentiel d'entrée du virus est donc envisageable mais ne peut, à elle seule, expliquer les différences observées ici. Il reste à déterminer si cette différence d'entrée du virus est due aux caractéristiques intrinsèques des cellules (expression de protéines de surfaces) ou à leur capacité de réponse antivirale.

Une autre hypothèse se fonde sur la capacité de réponse antivirale de la cellule. En effet, Wang *et al.* ont montré que la réponse aux IFN était à l'origine de la barrière d'espèce du MYXV et ont insisté sur la sensibilité du virus à ce type de réponse antivirale (Wang *et al.*, 2004). D'autres auteurs ont aussi insisté sur l'importance de la réponse aux IFN dans la pathogénicité du MYXV sur son hôte naturel ou sur des cellules humaines (Bartee and McFadden, 2009; Johnston *et al.*, 2005c; Wang *et al.*, 2009) . Il semble donc logique de supposer que différentes réponses antivirales des cellules tumorales puissent expliquer les différences observées entre les lignées cellulaires.

Ce différentiel de réponse aux IFN est bien connu en virothérapie oncolytique et notamment dans le cadre de l'utilisation du virus de la stomatite vésiculeuse. A l'image du MYXV ce virus est très sensible aux IFN. En effet l'intensité de la réponse aux IFN est capable d'expliquer les différentes sensibilités au VSV des cellules d'adénocarcinomes pancréatiques (Blackham *et al.*, 2013, 2014), prostatiques (Carey *et al.*, 2008) ou celles observées entre différentes lignées de cancer de la tête et du cou (Westcott *et al.*, 2015). L'importance de la réponse antivirale est aussi primordiale pour l'efficacité du virus de la rougeole (Berchtold *et al.*, 2013), du NDV (Buijs *et al.*, 2014) et du parvovirus H1 (Kaowinn *et al.*, 2015).

Dans le cadre des gliomes, le rôle de la réponse aux IFN est discutée : alors que Zemp *et al.* démontrent que la résistance des gliomes issues de souris Nf1<sup>(-/-)</sup>/Trp53<sup>(-/-)</sup> au MYXV n'est pas due aux IFN (Zemp *et al.*, 2013b), certains auteurs évoquent la présence de gliomes capables de développer une réponse antivirale fonctionnelle (Cosset *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2012). Cette faculté de réponse antivirale des gliomes a été mise en évidence pour d'autres virus comme le virus de la forêt de Semliki (Vähä-Koskela *et al.*, 2013) mais les preuves manquent pour confirmer son implication dans l'efficacité du MYXV. Cependant, compte tenu de leur importance pour d'autres virus oncolytiques et de la sensibilité du MYXV aux IFN, une réponse antivirale différente selon la lignée cellulaire est une hypothèse intéressante capable d'expliquer les différences observées entre J3T, D3T, SDT3, G06 et Raffray. De plus, cette hypothèse pourrait expliquer la présence de l'effet seuil observé dans notre étude. En effet, ce n'est qu'à partir d'une certaine quantité de particules virales qu'un effet lytique est observable, cette quantité étant faible pour J3T et D3T, intermédiaire pour SDT3 et forte pour G06 et Raffray. L'hypothèse impliquant les IFN peut alors être envisagée à l'échelle d'une lignée entière ou bien à l'échelle d'une sous-population cellulaire qui aurait conservé une réponse antivirale forte alors que d'autres auraient une réponse partielle voire absente. La mesure de la quantité d'IFN présent dans le milieu après l'infection par le MYXV pourrait permettre de comprendre un peu mieux les mécanismes impliqués dans la résistance au MYXV.

Dans ce cadre, l'utilisation d'inhibiteurs de la réponse aux IFN semble une solution intéressante pour augmenter l'efficacité du MYXV comme cela a déjà été montré pour le VSV dans le traitement des cancers de la tête et du cou (Escobar-Zarate *et al.*, 2013) ou des adénocarcinomes pancréatiques (Cataldi *et al.*, 2015).

Enfin la dérégulation des voies de signalisation peut être importante. En effet, alors que certaines mutations favoriseraient la réplication ou la cytotoxicité du MYXV, d'autres pourraient limiter son efficacité. Ainsi, comparer les marqueurs moléculaires des gliomes (Crespo *et al.*, 2015; Olar and Sulman, 2015) à l'efficacité du MYXV pourrait apporter des réponses importantes quant aux mécanismes impliqués dans son effet anti-tumoral comme cela a pu être fait pour le virus de la stomatite vésiculeuse (Blackham *et al.*, 2014). L'intérêt de ces marqueurs est donc double : (i) comprendre la sensibilité des cellules pour le MYXV (ii) adapter le traitement des patients atteints en fonction d'un panel de marqueurs prédéfinis et corrélés à l'efficacité du virus. On comprend alors ici l'intérêt croissant de la classification moléculaire des gliomes qui peut permettre la mise en place d'une thérapie adaptée pour chaque patient en fonction de voies de signalisation dérégulée.



## Quelques informations sur le mode de fonctionnement du MYXV sur les gliomes canins

Au-delà de la preuve de concept de l'intérêt du MYXV dans le traitement des gliomes canins, notre étude a permis de dégager quelques informations plus fondamentales sur le mode de fonctionnement du MYXV. En effet, de nombreuses études se sont intéressées à la pathogénie du virus sur le lapin (Best *et al.*, 2000; Stanford *et al.*, 2007c) mais peu ont réellement caractérisé son action sur les cellules tumorales. Tout d'abord, l'analyse de la capacité d'entrée du MYXV au sein des cellules nous a permis de mettre en évidence la saturation des cellules à l'entrée du virus. En effet, à MOI=0.5 et à MOI=3, la quantité de virus ayant pénétré au sein des J3T est voisine : autrement dit l'entrée du virus n'est pas proportionnelle à la quantité de virus présent dans l'inoculum. Par conséquent, la saturation de l'entrée du MYXV est envisageable. Cela serait cohérent avec la présence d'un récepteur saturable permettant l'entrée du MYXV comme cela a été évoqué par Chan *et al.* pour les lymphocytes normaux et tumoraux (Chan *et al.*, 2013b). De plus, notre étude a révélé la présence d'un effet seuil à partir duquel les effets lytiques du MYXV sont observables : ce seuil varie en fonction du type cellulaire et de la souche virale considérée. Enfin, nos résultats évoquent une action différente du MYXV en fonction de la MOI. Pour J3T, alors que la réplication virale est clairement démontrée à MOI=0.5, 1 et 3, celle-ci est remise en cause à MOI=5, que ce soit pour T1 ou SG33. Cet effet dépendant de la MOI a déjà été décrit pour d'autres virus dans d'autres systèmes cellulaires (Brand *et al.*, 1999; Brown and Bidle, 2014). Ainsi, de fortes MOI pourraient diminuer l'efficacité de réplication du virus, notamment en bloquant le cycle cellulaire, empêchant de ce fait la réplication virale intracellulaire. Par conséquent, l'utilisation de diverses MOI pourrait s'avérer utile afin de comprendre le mode de fonctionnement du MYXV dans le traitement des gliomes.

Malgré des incertitudes concernant les mécanismes de résistance du MYXV, notre étude a montré que ce virus était cytotoxique pour les cellules de gliomes canins. Nous avons aussi montré qu'au moins une partie des cellules était permissive au MYXV. De ce fait, l'utilisation du modèle chien semble pertinente dans l'étude du MYXV oncolytique. De plus, la supériorité de la souche SG33 par rapport à T1 est très intéressante car elle permet d'envisager l'utilisation d'un virus inoffensif, ce qui renforce d'autant plus l'intérêt du MYXV dans le traitement des gliomes.

## Les limites de l'étude

Malgré les résultats intéressants qu'apportent cette étude, plusieurs limites sont à souligner. Tout d'abord, nous n'avons pas clairement démontré la permissivité des cellules au MYXV. Alors que l'utilisation de faibles MOI (0.5, 1, 3) a permis de constater la permissivité des J3T au MYXV, les trop fortes MOI utilisées pour les autres lignées cellulaires nous ont empêché de conclure. De nouvelles expériences utilisant de faibles MOI pourront permettre de répondre à cette question dans un second temps. Cependant, même si usuellement, la permissivité des cellules pour un virus oncolytique est un critère majeur, il semble que la présence d'une infection productive ne soit pas indispensable à son potentiel (Madlambayan *et al.*, 2012). En effet, le MYXV n'est pas capable de se multiplier au sein de deux lignées de leucémie myéloïdes aigues mais sa simple fixation aux cellules limite leur croissance après injection à des rongeurs immunodéprimés. Autrement dit, grâce à sa fixation, le MYXV est capable de diminuer l'agressivité des cellules tumorales et répond alors aux critères du virus oncolytique.

Notre étude a démontré la cytotoxicité du MYXV pour différentes lignées de gliomes canins. Cependant, l'étude de lignées cellulaires n'est pas représentative du panel très large de gliomes que l'on trouve chez l'Homme ou le chien. En effet, les gliomes sont un groupe hétérogène de tumeurs regroupant des entités parfois très différentes (Louis *et al.*, 2007; Olar and Sulman, 2015). L'étude de quelques lignées n'est pas suffisante pour tirer des conclusions optimales. Tester l'efficacité du MYXV sur des cellules primaires issues directement de prélèvement de gliomes canins peut s'avérer très utile afin d'augmenter la représentativité de nos résultats.

L'autre limite concerne l'évaluation de la mortalité cellulaire après infection. Depuis sa mise au point dans les années 1980 (Mosmann, 1983), la réduction du tétrazolium en formozan est couramment utilisée dans la quantification de l'effet cytotoxique des différentes molécules. L'évaluation de la cytotoxicité du MXYV sur les cellules tumorales se fonde aussi souvent sur ce test (Lamb *et al.*, 2014; Lun *et al.*, 2005, 2007; Weng *et al.*, 2014; Wennier *et al.*, 2012). Cependant, lors de notre étude, des résultats surprenants ont été observés. En effet, l'absorbance des lignées G06 ou SDT3 après l'infection par la souche T1 était supérieure à celle du contrôle non infecté : cela remet donc en question la confiance que l'on peut accorder aux autres résultats obtenus avec le MTS test. Plusieurs auteurs ont mis en évidence des interférences impliquées dans la réduction du tétrazolium en formozan. Normalement, la déshydrogénase succinate mitochondriale est l'enzyme qui permet la formation de formozan, mais en réalité, d'autres

enzymes sont impliquées dans la réduction du tétrazolium (Stepanenko and Dmitrenko, 2015). En effet une douzaine d'enzymes mitochondriales ou cytosoliques peuvent modifier le résultat du MTS test. De plus, la concentration du glucose cellulaire, l'intensité de la glycolyse ou encore le rapport NADH/NAPDH peuvent altérer ces résultats. Par conséquent, le MTS test reflète plus la somme de nombreuses réactions enzymatiques intracellulaires que le nombre de cellules viables. En outre, l'utilisation d'agents cytotoxiques comme l'imatinib ou le témozolomide peut modifier le métabolisme cellulaire et entraîner une sous- ou une surestimation de la viabilité cellulaire (Stepanenko and Dmitrenko, 2015). De même, l'activation des macrophages par des lipopolysaccharides bactériens entraîne une augmentation artéfactuelle de la viabilité cellulaire mesurée par le MTS test (Pozzolini *et al.*, 2003). D'autres études ont montré que des modifications de la concentration en glucose ou du pH du milieu pouvaient modifier les résultats fournis par le MTS test (Marshall *et al.*, 1995). Or, selon la vitesse de multiplication ces paramètres sont modifiés au sein du milieu de culture. Toutes ces informations permettent alors de prendre du recul sur les résultats de viabilité obtenu dans notre étude. En effet, ces résultats doivent être interprétés avec précaution et les différences subtiles que l'on pouvait observer entre J3T, D3T et SDT3 après l'infection par SG33 ne sont pas réellement interprétables. A l'inverse, il est possible que certaines différences soient sous-estimées par le MTS test. Il est donc nécessaire de multiplier les moyens d'évaluation de la cytotoxicité du MYXV. Par exemple, l'utilisation de la cytométrie en flux pourrait permettre de pallier les déficiences du MTS test. De plus, son utilisation pourrait nous renseigner sur la part d'apoptose et de nécrose impliquée dans la cytotoxicité du MYXV. L'utilisation de la cytométrie en flux à des temps précoces pourrait aussi nous permettre de savoir si la mortalité cellulaire observée est due à la multiplication virale ou bien à un effet toxique du virus dont l'entrée entrainerait la cascade de signalisation menant à l'apoptose cellulaire.

Notre étude est fondée sur l'utilisation *in vitro* du MYXV dans la thérapie du gliome, or cela ne récapitule pas les multitudes interactions qui existent *in vivo* entre le virus et le système immunitaire notamment. En effet, Zemp *et al.* ont bien montré grâce au modèle rongeur que les cellules immunitaires péri-tumorales étaient à l'origine d'une élimination rapide du virus *in vivo* (Zemp *et al.*, 2014). Par conséquent, notre étude ne prenant pas en compte cette partie fondamentale de l'utilisation du virus, reste incomplète. Cependant, l'étude *in vitro est* indispensable avant d'envisager l'utilisation du chien en tant que modèle. Avant d'approcher cette étape du projet, l'étude d'un système cellulaire mêlant gliomes et cellules immunitaires peritumorales pourrait permettre de comprendre les raisons de l'élimination du virus *in vivo* et d'ainsi améliorer l'efficacité du MYXV contre les gliomes.

## Des possibilités d'investigations futures

Nous avons montré qu'*in vitro*, le virus SG33 était supérieur au virus T1 dans le traitement des gliomes. Cependant, bien que cette souche virale soit, a priori, inoffensive nous n'avons pas démontré son innocuité envers des cellules canines « normales ». Cette étape sera alors indispensable avant d'envisager le passage aux essais sur les chiens vivants. Sachant que nous ne savons pas encore si la mortalité cellulaire est due à la multiplication virale ou à un effet toxique du virus, il sera d'autant plus important d'attester de la survie des cellules normales.

Nous avons discuté précédemment des limites à l'utilisation de lignées cellulaires de gliomes canins. Par conséquent l'utilisation de cellules primaires est indispensable pour augmenter la représentativité de nos résultats. De plus, malgré les informations précieuses qu'il fournit, le MTS test n'est pas idéal et d'autres mesures de la viabilité cellulaire sont donc nécessaires afin de confirmer nos résultats.

Notre étude a montré que l'infection par le MYXV ne permettait pas d'atteindre 100% de mortalité cellulaire. Cela semble dû à la présence de sous-populations résistantes. L'exacerbation de la réponse antivirale pour ces cellules peut être un élément de réponse. Mais l'existence des cellules souches cancéreuses (CSC) ou BTIC peut être une autre hypothèse. En effet, plusieurs auteurs ont montré que ces CSC présentaient une résistance particulière aux traitements conventionnels comme la chimiothérapie ou la radiothérapie dans de nombreux cancers (Yoshida and Saya, 2015). Les CSC de gliomes se sont montrées résistantes au témozolomide, à l'étoposide et aux radiations ionisantes (Friedman *et al.*, 2013). Certains virus oncolytiques comme les adenovirus (Dey *et al.*, 2010), le virus de la rougeole (Allen *et al.*, 2013) ou l'HHV1 (Friedman *et al.*, 2013) sont cependant capables de les détruire. Pour ce qui est du MYXV, les études disponibles ne démontrent pas clairement une efficacité marquée contre les CSC : en effet, pour Zemp *et al.*, seulement 50% des BTIC étaient sensibles au MYXV. De plus, la cytotoxicité du virus pour les sphéroïdes (considéré comme des CSC) de carcinomes ovariens étaient amoindrie par rapport à une culture traditionnelle en monocouche (Correa *et al.*, 2012). Cette relative inefficacité du MYXV envers les CSC de gliomes a entraîné la recherche d'agents thérapeutiques capables d'optimiser la réponse anti-tumorale du virus (McKenzie *et al.*, 2015). Par conséquent, il serait intéressant de tester l'efficacité du virus SG33 sur des CSC de gliomes canins obtenues à partir des lignées étudiées.

L'importance du système immunitaire péritumoral décrit par Zemp *et al.* confirme l'importance du modèle *in vivo* (Zemp *et al.*, 2014). En effet, même si le virus est très intéressant

*in vitro* ou sur des modèles souris immunodéprimés, l'utilisation du modèle chien est indispensable afin de prouver l'efficacité du MYXV dans la thérapie des gliomes.

Malgré les résultats intéressants de notre étude qui tendent à confirmer l'intérêt du MYXV dans le traitement des gliomes, des limites majeures sont présentes. La réalisation d'investigations plus poussées pourrait permettre de confirmer nos résultats et d'envisager l'optimisation du MYXV afin d'en faire le candidat idéal pour la virothérapie oncolytique des gliomes.

## Conclusion générale

Cette étude a permis de confirmer l'intérêt du modèle chien dans la recherche translationnelle sur le gliome. En effet, bien qu'à des concentrations différentes, le MYXV est cytotoxique pour l'ensemble des lignées cellulaires de gliome canin étudiées. De plus, le virus semble capable de se multiplier au sein de ces cellules. En outre, il semble que le virus SG33, soit plus cytotoxique que le virus T1. Ce résultat est particulièrement intéressant puisqu'il sous-entend qu'une souche a priori inoffensive peut être plus efficace qu'une souche de terrain plus pathogène. Même si les lignées de gliome canin utilisées répondent au MYXV, des différences marquées existent entre elles. Une explication possible réside dans des niveaux variables d'expression d'Akt phosphorylé mais d'autres mécanismes impliquant la pénétration du virus. Le différentiel de réponse antivirale, ou la présence de cellules souches cancéreuses au sein des lignées étudiées peut avoir un rôle à jouer. Comprendre l'origine de ces différences pourrait permettre d'optimiser au mieux le virus afin de détruire un large spectre de gliome, quelle que soit leur origine tissulaire ou leur profil moléculaire.

Le MYXV apparaît donc ici intéressant sur plusieurs lignées de gliomes canins *in vitro* et il sera ensuite important de confirmer son efficacité sur des cellules primaires de gliomes canins ainsi que son innocuité sur un panel de cellules canines normales. Si le MYXV s'avère intéressant, il pourra alors être testé *in vivo* sur des chiens atteints de gliome afin d'envisager le traitement des gliomes dans son ensemble. En effet, la prise en compte du système immunitaire est primordiale, à la fois en tant que frein à la persistance du virus mais aussi en tant qu'atout à la thérapie anti-tumorale.

L'utilisation du modèle chien s'avère donc particulièrement intéressante *in vitro* mais semble encore plus pertinente *in vivo*. La route du MYXV dans la thérapie des gliomes semble toute tracée et l'utilisation du modèle chien apparaît comme un outil de choix. Ce modèle nous indiquera alors peut-être si le MYXV peut devenir un agent thérapeutique de choix dans la thérapie des gliomes de l'Homme.

## Bibliographie

- Adams, M.M., van Leeuwen, B.H., McFadden, G., and Kerr, P.J. (2008). Construction and testing of a novel host-range defective myxoma virus vaccine with the M063 gene inactivated that is non-permissive for replication in rabbit cells. *Vet. Res.* 39, 60.
- Agnihotri, S., Burrell, K.E., Wolf, A., Jalali, S., Hawkins, C., Rutka, J.T., and Zadeh, G. (2013). Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 61, 25–41.
- Ahlander, J., and Bosco, G. (2009). The RB/E2F pathway and regulation of RNA processing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 384, 280–283.
- Akhavan, D., Cloughesy, T.F., and Mischel, P.S. (2010). mTOR signaling in glioblastoma: lessons learned from bench to bedside. *Neuro-Oncol.* 12, 882–889.
- Alifieris, C., and Trafalis, D.T. (2015). Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol. Ther.* 152, 63–82.
- Allen, C., Opyrchal, M., Aderca, I., Schroeder, M.A., Sarkaria, J.N., Domingo, E., Federspiel, M.J., and Galanis, E. (2013). Oncolytic measles virus strains have significant antitumor activity against glioma stem cells. *Gene Ther.* 20, 444–449.
- Alloussi, S.H., Alkassar, M., Urbschat, S., Graf, N., and Gärtner, B. (2011). All reovirus subtypes show oncolytic potential in primary cells of human high-grade glioma. *Oncol. Rep.* 26, 645–649.
- Alonso, M.M., Fueyo, J., Shay, J.W., Aldape, K.D., Jiang, H., Lee, O.-H., Johnson, D.G., Xu, J., Kondo, Y., Kanzawa, T., *et al.* (2005). Expression of transcription factor E2F1 and telomerase in glioblastomas: mechanistic linkage and prognostic significance. *J. Natl. Cancer Inst.* 97, 1589–1600.
- Alonso, M.M., Cascallo, M., Gomez-Manzano, C., Jiang, H., Bekele, B.N., Perez-Gimenez, A., Lang, F.F., Piao, Y., Alemany, R., and Fueyo, J. (2007a). ICOVIR-5 shows E2F1 addiction and potent antiglioma effect in vivo. *Cancer Res.* 67, 8255–8263.
- Alonso, M.M., Gomez-Manzano, C., Jiang, H., Bekele, N.B., Piao, Y., Yung, W.K.A., Alemany, R., and Fueyo, J. (2007b). Combination of the oncolytic adenovirus ICOVIR-5 with chemotherapy provides enhanced anti-glioma effect in vivo. *Cancer Gene Ther.* 14, 756–761.
- Amelio, D., and Amichetti, M. (2012). Radiation therapy for the treatment of recurrent glioblastoma: an overview. *Cancers* 4, 257–280.
- Azevedo, F.A.C., Carvalho, L.R.B., Grinberg, L.T., Farfel, J.M., Ferretti, R.E.L., Leite, R.E.P., Jacob Filho, W., Lent, R., anderculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J. Comp. Neurol.* 513, 532–541.

- Bailey, O.T. (1985). Genesis of the Percival Bailey-Cushing classification of gliomas. *Pediatr. Neurosci.* *12*, 261–265.
- Baldi, I., Gruber, A., Alioum, A., Berteaud, E., Lebailly, P., Huchet, A., Tourdias, T., Kantor, G., Maire, J.P., Vital, A., *et al.* (2011). Descriptive epidemiology of CNS tumors in France: results from the Gironde Registry for the period 2000–2007. *Neuro-Oncol.* *13*, 1370–1378.
- Barnett, B.G., Crews, C.J., and Douglas, J.T. (2002). Targeted adenoviral vectors. *Biochim. Biophys. Acta* *1575*, 1–14.
- Barrett, J.W., Sypula, J., Wang, F., Alston, L.R., Shao, Z., Gao, X., Irvine, T.S., and McFadden, G. (2007a). M135R is a novel cell surface virulence factor of myxoma virus. *J. Virol.* *81*, 106–114.
- Barrett, J.W., Alston, L.R., Wang, F., Stanford, M.M., Gilbert, P.-A., Gao, X., Jimenez, J., Villeneuve, D., Forsyth, P., and McFadden, G. (2007b). Identification of host range mutants of myxoma virus with altered oncolytic potential in human glioma cells. *J. Neurovirol.* *13*, 549–560.
- Bartee, E., and McFadden, G. (2009). Human cancer cells have specifically lost the ability to induce the synergistic state caused by tumor necrosis factor plus interferon-beta. *Cytokine* *47*, 199–205.
- Bartee, M.Y., Chen, H., Dai, E., Liu, L.Y., Davids, J.A., and Lucas, A. (2014). Defining the anti-inflammatory activity of a potent myxomaviral chemokine modulating protein, M-T7, through site directed mutagenesis. *Cytokine* *65*, 79–87.
- Bastien, J.I.L., McNeill, K.A., and Fine, H.A. (2015). Molecular characterizations of glioblastoma, targeted therapy, and clinical results to date. *Cancer* *121*, 502–516.
- Belman, N., Bonnem, E.M., Harvey, H.A., and Lipton, A. (1996). Phase I trial of recombinant platelet factor 4 (rPF4) in patients with advanced colorectal carcinoma. *Invest. New Drugs* *14*, 387–389.
- Berchtold, S., Lampe, J., Weiland, T., Smirnow, I., Schleicher, S., Handgretinger, R., Kopp, H.-G., Reiser, J., Stubenrauch, F., Mayer, N., *et al.* (2013). Innate immune defense defines susceptibility of sarcoma cells to measles vaccine virus-based oncolysis. *J. Virol.* *87*, 3484–3501.
- Berens, M.E., Bjotvedt, G., Levesque, D.C., Rief, M.D., Shapiro, J.R., and Coons, S.W. (1993). Tumorigenic, invasive, karyotypic, and immunocytochemical characteristics of clonal cell lines derived from a spontaneous canine anaplastic astrocytoma. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* *29A*, 310–318.
- Berghauer Pont, L.M.E., Kleijn, A., Kloezeman, J.J., van den Bossche, W., Kaufmann, J.K., de Vrij, J., Leenstra, S., Dirven, C.M.F., and Lamfers, M.L.M. (2015). The HDAC Inhibitors Scriptaid and LBH589 Combined with the Oncolytic Virus Delta24-RGD Exert Enhanced Anti-Tumor Efficacy in Patient-Derived Glioblastoma Cells. *PLoS One* *10*, e0127058.
- Best, S.M., Collins, S.V., and Kerr, P.J. (2000). Coevolution of host and virus: cellular localization of virus in myxoma virus infection of resistant and susceptible European rabbits. *Virology* *277*, 76–91.



Bischoff, J.R., Kirn, D.H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J.A., Sampson-Johannes, A., Fattaey, A., *et al.* (1996). An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 274, 373–376.

Blackham, A.U., Northrup, S.A., Willingham, M., D'Agostino, R.B., Lyles, D.S., and Stewart, J.H. (2013). Variation in susceptibility of human malignant melanomas to oncolytic vesicular stomatitis virus. *Surgery* 153, 333–343.

Blackham, A.U., Northrup, S.A., Willingham, M., Sirintrapun, J., Russell, G.B., Lyles, D.S., and Stewart, J.H. (2014). Molecular determinants of susceptibility to oncolytic vesicular stomatitis virus in pancreatic adenocarcinoma. *J. Surg. Res.* 187, 412–426.

Blanie, S. (2009). Les protéines à motif Ankyrine du virus myxomateux : caractérisation et implication dans le pouvoir pathogène (Thèse d'université - Toulouse 3).

Blanié, S., Gelfi, J., Bertagnoli, S., and Camus-Bouclainville, C. (2010). MNF, an ankyrin repeat protein of myxoma virus, is part of a native cellular SCF complex during viral infection. *Virol. J.* 7, 56.

Bluming, A.Z., and Ziegler, J.L. (1971). Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection. *Lancet Lond. Engl.* 2, 105–106.

Boudreau, C.E., York, D., Higgins, R.J., LeCouteur, R.A., and Dickinson, P.J. (2015). Molecular signalling pathways in canine gliomas. *Vet. Comp. Oncol.*

Braidwood, L., Graham, S., Graham, A., and Conner, J. (2013). Oncolytic herpes viruses, chemotherapeutics, and other cancer drugs. *Oncolytic Virotherapy* 57.

Brand, K., Klocke, R., Possling, A., Paul, D., and Strauss, M. (1999). Induction of apoptosis and G2/M arrest by infection with replication-deficient adenovirus at high multiplicity of infection. *Gene Ther.* 6, 1054–1063.

Bray, F., Ren, J.-S., Masuyer, E., and Ferlay, J. (2013). Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int. J. Cancer* 132, 1133–1145.

Brown, C.M., and Bidle, K.D. (2014). Attenuation of virus production at high multiplicities of infection in *Aureococcus anophagefferens*. *Virology* 466-467, 71–81.

Buijs, P.R.A., van Eijck, C.H.J., Hofland, L.J., Fouchier, R. a. M., and van den Hoogen, B.G. (2014). Different responses of human pancreatic adenocarcinoma cell lines to oncolytic Newcastle disease virus infection. *Cancer Gene Ther.* 21, 24–30.

Burke, J., Nieva, J., Borad, M.J., and Breitbach, C.J. (2015). Oncolytic viruses: perspectives on clinical development. *Curr. Opin. Virol.* 13, 55–60.

Cameron, C.M., Barrett, J.W., Mann, M., Lucas, A., and McFadden, G. (2005a). Myxoma virus M128L is expressed as a cell surface CD47-like virulence factor that contributes to the downregulation of macrophage activation in vivo. *Virology* 337, 55–67.

Cameron, C.M., Barrett, J.W., Liu, L., Lucas, A.R., and McFadden, G. (2005b). Myxoma virus M141R expresses a viral CD200 (vOX-2) that is responsible for down-regulation of macrophage and T-cell activation in vivo. *J. Virol.* 79, 6052–6067.



- Camus-Bouclainville, C., Fiette, L., Bouchiha, S., Pignolet, B., Counor, D., Filipe, C., Gelfi, J., and Messud-Petit, F. (2004). A virulence factor of myxoma virus colocalizes with NF-kappaB in the nucleus and interferes with inflammation. *J. Virol.* *78*, 2510–2516.
- Camus-Bouclainville, C., Gretillat, M., Py, R., Gelfi, J., Guérin, J.L., and Bertagnoli, S. (2011). Genome sequence of SG33 strain and recombination between wild-type and vaccine myxoma viruses. *Emerg. Infect. Dis.* *17*, 633–638.
- Cancer Genome Atlas Research Network (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* *455*, 1061–1068.
- Candolfi, M., Curtin, J.F., Nichols, W.S., Muhammad, A.G., King, G.D., Pluhar, G.E., McNiell, E.A., Ohlfest, J.R., Freese, A.B., Moore, P.F., *et al.* (2007a). Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. *J. Neurooncol.* *85*, 133–148.
- Candolfi, M., Kroeger, K.M., Pluhar, G.E., Bergeron, J., Puntel, M., Curtin, J.F., McNiell, E.A., Freese, A.B., Ohlfest, J.R., Moore, P., *et al.* (2007b). Adenoviral-mediated gene transfer into the canine brain in vivo. *Neurosurgery* *60*, 167–177; discussion 178.
- Carey, B.L., Ahmed, M., Puckett, S., and Lyles, D.S. (2008). Early steps of the virus replication cycle are inhibited in prostate cancer cells resistant to oncolytic vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* *82*, 12104–12115.
- Carlsson, S.K., Brothers, S.P., and Wahlestedt, C. (2014). Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. *EMBO Mol. Med.* *6*, 1359–1370.
- Cassel, W.A., and Garrett, R.E. (1965). Newcastle Disease virus as an antineoplastic agent, *Cancer* *18*, 863–868.
- Castro, B.A., and Aghi, M.K. (2014). Bevacizumab for glioblastoma: current indications, surgical implications, and future directions. *Neurosurg. Focus* *37*, E9.
- Cataldi, M., Shah, N.R., Felt, S.A., and Grdzlishvili, V.Z. (2015). Breaking resistance of pancreatic cancer cells to an attenuated vesicular stomatitis virus through a novel activity of IKK inhibitor TPCA-1. *Virology* *485*, 340–354.
- Chaichana, K.L., Halthore, A.N., Parker, S.L., Olivi, A., Weingart, J.D., Brem, H., and Quinones-Hinojosa, A. (2011). Factors involved in maintaining prolonged functional independence following supratentorial glioblastoma resection. Clinical article. *J. Neurosurg.* *114*, 604–612.
- Chambless, L.B., Kistka, H.M., Parker, S.L., Hassam-Malani, L., McGirt, M.J., and Thompson, R.C. (2015). The relative value of postoperative versus preoperative Karnofsky Performance Scale scores as a predictor of survival after surgical resection of glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.* *121*, 359–364.
- Chan, W.M., and McFadden, G. (2014). Oncolytic Poxviruses. *Annu. Rev. Virol.* *1*, 119–141.
- Chan, D.T.M., Kam, M.K.M., Ma, B.B.Y., Ng, S.C.P., Pang, J.C.S., Lau, C.K.Y., Siu, D.Y.W., Ng, B.S.L., Zhu, X.L., Chen, G.G., *et al.* (2011). Association of molecular marker O(6)-Methylguanine DNA methyltransferase and concomitant chemoradiotherapy with

survival in Southern Chinese glioblastoma patients. *Hong Kong Med. J. Xianggang Yi Xue Za Zhi Hong Kong Acad. Med.* 17, 184–188.

Chan, W.M., Rahman, M.M., and McFadden, G. (2013a). Oncolytic myxoma virus: the path to clinic. *Vaccine* 31, 4252–4258.

Chan, W.M., Bartee, E.C., Moreb, J.S., Dower, K., Connor, J.H., and McFadden, G. (2013b). Myxoma and Vaccinia Viruses Bind Differentially to Human Leukocytes. *J. Virol.* 87, 4445–4460.

Chen, C., Xu, T., Lu, Y., Chen, J., and Wu, S. (2013a). The efficacy of temozolomide for recurrent glioblastoma multiforme. *Eur. J. Neurol. Off. J. Eur. Fed. Neurol. Soc.* 20, 223–230.

Chen, L., Zhang, Y., Yang, J., Hagan, J.P., and Li, M. (2013b). Vertebrate animal models of glioma: understanding the mechanisms and developing new therapies. *Biochim. Biophys. Acta* 1836, 158–165.

Chinot, O.L., Wick, W., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Nishikawa, R., Carpentier, A.F., Hoang-Xuan, K., Kavan, P., Cernea, D., *et al.* (2014). Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 370, 709–722.

Chiocca, E.A., Abbed, K.M., Tatter, S., Louis, D.N., Hochberg, F.H., Barker, F., Kracher, J., Grossman, S.A., Fisher, J.D., Carson, K., *et al.* (2004). A phase I open-label, dose-escalation, multi-institutional trial of injection with an E1B-Attenuated adenovirus, ONYX-015, into the peritumoral region of recurrent malignant gliomas, in the adjuvant setting. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 10, 958–966.

Choe, G., Horvath, S., Cloughesy, T.F., Crosby, K., Seligson, D., Palotie, A., Inge, L., Smith, B.L., Sawyers, C.L., and Mischel, P.S. (2003). Analysis of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma patients in vivo. *Cancer Res.* 63, 2742–2746.

Chou, J., Kern, E.R., Whitley, R.J., and Roizman, B. (1990). Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to gamma 134.5, a gene nonessential for growth in culture. *Science* 250, 1262–1266.

Claes, A., Schuurings, J., Boots-Sprenger, S., Hendriks-Cornelissen, S., Dekkers, M., van der Kogel, A.J., Leenders, W.P., Wesseling, P., and Jeuken, J.W. (2008). Phenotypic and genotypic characterization of orthotopic human glioma models and its relevance for the study of anti-glioma therapy. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 18, 423–433.

Coffey, M.C., Strong, J.E., Forsyth, P.A., and Lee, P.W. (1998). Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science* 282, 1332–1334.

Collin, N., Guérin, J.-L., Drexler, I., Blanié, S., Gelfi, J., Boullier, S., Foucras, G., Sutter, G., and Messud-Petit, F. (2005). The poxviral scrapin MV-LAP requires a myxoma viral infection context to efficiently downregulate MHC-I molecules. *Virology* 343, 171–178.

Condit, R.C., Moussatche, N., and Traktman, P. (2006). In a nutshell: structure and assembly of the vaccinia virion. *Adv. Virus Res.* 66, 31–124.

Correa, R.J.M., Komar, M., Tong, J.G.K., Sivapragasam, M., Rahman, M.M., McFadden, G., Dimattia, G.E., and Shepherd, T.G. (2012). Myxoma virus-mediated oncolysis of ascites-

derived human ovarian cancer cells and spheroids is impacted by differential AKT activity. *Gynecol. Oncol.* *125*, 441–450.

Cosset, É., Petty, T.J., Dutoit, V., Cordey, S., Padiou, I., Otten-Hernandez, P., Farinelli, L., Kaiser, L., Bruyère-Cerdan, P., Tirefort, D., *et al.* (2014). Comprehensive metagenomic analysis of glioblastoma reveals absence of known virus despite antiviral-like type I interferon gene response. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *135*, 1381–1389.

Costello, J.F. (2003). DNA methylation in brain development and gliomagenesis. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *8*, s175–s184.

Crespo, I., Vital, A.L., Gonzalez-Tablas, M., Patino, M. del C., Otero, A., Lopes, M.C., de Oliveira, C., Domingues, P., Orfao, A., and Tabernero, M.D. (2015). Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme. *Am. J. Pathol.* *185*, 1820–1833.

Csatary, L.K., and Bakács, T. (1999). Use of Newcastle disease virus vaccine (MTH-68/H) in a patient with high-grade glioblastoma. *JAMA* *281*, 1588–1589.

Csatary, L.K., Gosztonyi, G., Szeberenyi, J., Fabian, Z., Liszka, V., Bodey, B., and Csatary, C.M. (2004). MTH-68/H oncolytic viral treatment in human high-grade gliomas. *J. Neurooncol.* *67*, 83–93.

DeLange, A.M., and McFadden, G. (1990). The role of telomeres in poxvirus DNA replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *163*, 71–92.

Dey, M., Ulasov, I.V., and Lesniak, M.S. (2010). Virotherapy against malignant glioma stem cells. *Cancer Lett.* *289*, 1–10.

Dhermain, F. (2014). Radiotherapy of high-grade gliomas: current standards and new concepts, innovations in imaging and radiotherapy, and new therapeutic approaches. *Chin. J. Cancer* *33*, 16–24.

Dickinson, P.J., Roberts, B.N., Higgins, R.J., Leutenegger, C.M., Bollen, A.W., Kass, P.H., and LeCouteur, R.A. (2006). Expression of receptor tyrosine kinases VEGFR-1 (FLT-1), VEGFR-2 (KDR), EGFR-1, PDGFRalpha and c-Met in canine primary brain tumours. *Vet. Comp. Oncol.* *4*, 132–140.

Dickinson, P.J., LeCouteur, R.A., Higgins, R.J., Bringas, J.R., Larson, R.F., Yamashita, Y., Krauze, M.T., Forsayeth, J., Noble, C.O., Drummond, D.C., *et al.* (2010). Canine spontaneous glioma: a translational model system for convection-enhanced delivery. *Neuro-Oncol.* *12*, 928–940.

Dock, G. (1904). The Influence of Complicating Diseases Upon Leukaemia\*. *Am. J. Med. Sci.* *127*, 563–592.

Dolecek, T.A., Propp, J.M., Stroup, N.E., and Kruchko, C. (2012). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2005–2009. *Neuro-Oncol.* *14*, v1–v49.

Doty, R.A., Liu, J., McFadden, G., Roy, E.J., and MacNeill, A.L. (2013). Histological evaluation of intratumoral myxoma virus treatment in an immunocompetent mouse model of melanoma. *Oncolytic Virotherapy* *2*, 1–17.

- Douglas, A.E., Corbett, K.D., Berger, J.M., McFadden, G., and Handel, T.M. (2007). Structure of M11L: A myxoma virus structural homolog of the apoptosis inhibitor, Bcl-2. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *16*, 695–703.
- Du, Z., Whitt, M.A., Baumann, J., Garner, J.M., Morton, C.L., Davidoff, A.M., and Pfeffer, L.M. (2012). Inhibition of type I interferon-mediated antiviral action in human glioma cells by the IKK inhibitors BMS-345541 and TPCA-1. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* *32*, 368–377.
- Duteyrat, J.-L., Gelfi, J., and Bertagnoli, S. (2006). Ultrastructural study of myxoma virus morphogenesis. *Arch. Virol.* *151*, 2161–2180.
- ElBanan, M.G., Amer, A.M., Zinn, P.O., and Colen, R.R. (2015). Imaging genomics of Glioblastoma: state of the art bridge between genomics and neuroradiology. *Neuroimaging Clin. N. Am.* *25*, 141–153.
- Ellingson, B.M. (2014). Radiogenomics and Imaging Phenotypes in Glioblastoma: Novel Observations and Correlation with Molecular Characteristics. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* *15*, 1–12.
- Escobar-Zarate, D., Liu, Y.-P., Suksanpaisan, L., Russell, S.J., and Peng, K.-W. (2013). Overcoming cancer cell resistance to VSV oncolysis with JAK1/2 inhibitors. *Cancer Gene Ther.* *20*, 582–589.
- Fenner, F., and Chapple, P.J. (1965). Evolutionary changes in myxoma virus in Britain. An examination of 222 naturally occurring strains obtained from 80 counties during the period October-November 1962, *J. Hyg. (Lond.)* *63*, 175–185.
- Field, K.M., Jordan, J.T., Wen, P.Y., Rosenthal, M.A., and Reardon, D.A. (2015). Bevacizumab and glioblastoma: scientific review, newly reported updates, and ongoing controversies. *Cancer* *121*, 997–1007.
- Fournier, P., and Schirmacher, V. (2013). Oncolytic Newcastle Disease Virus as Cutting Edge between Tumor and Host. *Biology* *2*, 936–975.
- France, M.R., Thomas, D.L., Liu, J., McFadden, G., MacNeill, A.L., and Roy, E.J. (2011). Intraventricular injection of myxoma virus results in transient expression of viral protein in mouse brain ependymal and subventricular cells. *J. Gen. Virol.* *92*, 195–199.
- Freeman, A.I., Zakay-Rones, Z., Gomori, J.M., Linetsky, E., Rasooly, L., Greenbaum, E., Rozenman-Yair, S., Panet, A., Libson, E., Irving, C.S., *et al.* (2006). Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *13*, 221–228.
- Friedman, G.K., Raborn, J., Kelly, V.M., Cassady, K.A., Markert, J.M., and Gillespie, G.Y. (2013). Pediatric glioma stem cells: biologic strategies for oncolytic HSV virotherapy. *Front. Oncol.* *3*.
- Fueyo, J., Gomez-Manzano, C., Alemany, R., Lee, P.S., McDonnell, T.J., Mitlianga, P., Shi, Y.X., Levin, V.A., Yung, W.K., and Kyritsis, A.P. (2000). A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene* *19*, 2–12.

Fueyo, J., Alemany, R., Gomez-Manzano, C., Fuller, G.N., Khan, A., Conrad, C.A., Liu, T.-J., Jiang, H., Lemoine, M.G., Suzuki, K., *et al.* (2003). Preclinical characterization of the antiglioma activity of a tropism-enhanced adenovirus targeted to the retinoblastoma pathway. *J. Natl. Cancer Inst.* *95*, 652–660.

Fujita, M., Scheurer, M.E., Decker, S.A., McDonald, H.A., Kohanbash, G., Kasthuber, E.R., Kato, H., Bondy, M.L., Ohlfest, J.R., and Okada, H. (2010). Role of type 1 IFNs in antiglioma immunosurveillance--using mouse studies to guide examination of novel prognostic markers in humans. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *16*, 3409–3419.

Georger, B., Grill, J., Opolon, P., Morizet, J., Aubert, G., Terrier-Lacombe, M.-J., Bressac De-Paillerets, B., Barrois, M., Feunteun, J., Kim, D.H., *et al.* (2002). Oncolytic activity of the E1B-55 kDa-deleted adenovirus ONYX-015 is independent of cellular p53 status in human malignant glioma xenografts. *Cancer Res.* *62*, 764–772.

Grabowski, M.M., Recinos, P.F., Nowacki, A.S., Schroeder, J.L., Angelov, L., Barnett, G.H., and Vogelbaum, M.A. (2014). Residual tumor volume versus extent of resection: predictors of survival after surgery for glioblastoma. *J. Neurosurg.* *121*, 1115–1123.

Gretillat, M. (2009). Etude d'un virus myxomateux optimisé pour la virothérapie anticancéreuse chez l'Homme (Thèse d'université - Toulouse 3).

Gross, S. (1971). Measles and leukaemia. *Lancet Lond. Engl.* *1*, 397–398.

Guerin, J.L., Gelfi, J., Camus, C., Delverdier, M., Whisstock, J.C., Amardeihl, M.F., Py, R., Bertagnoli, S., and Messud-Petit, F. (2001). Characterization and functional analysis of Serp3: a novel myxoma virus-encoded serpin involved in virulence. *J. Gen. Virol.* *82*, 1407–1417.

Guerin, J.-L., Gelfi, J., Boullier, S., Delverdier, M., Bellanger, F.-A., Bertagnoli, S., Drexler, I., Sutter, G., and Messud-Petit, F. (2002). Myxoma virus leukemia-associated protein is responsible for major histocompatibility complex class I and Fas-CD95 down-regulation and defines scrapins, a new group of surface cellular receptor abductor proteins. *J. Virol.* *76*, 2912–2923.

Hammon, W.M., Yohn, D.S., Casto, B.C., and Atchison, R.W. (1963). Oncolytic potentials of nonhuman viruses for human cancer. I. Effects of twenty-four viruses on human cancer cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* *31*, 329–345.

Hampl, J.A., Camp, S.M., Mydlarz, W.K., Hampl, M., Ichikawa, T., Chiocca, E.A., Louis, D.N., Sena-Esteves, M., and Breakefield, X.O. (2003). Potentiated gene delivery to tumors using herpes simplex virus/Epstein-Barr virus/RV tribrid amplicon vectors. *Hum. Gene Ther.* *14*, 611–626.

Harrington, K.J., Karapanagiotou, E.M., Roulstone, V., Twigger, K.R., White, C.L., Vidal, L., Beirne, D., Prestwich, R., Newbold, K., Ahmed, M., *et al.* (2010). Two-Stage Phase I Dose-Escalation Study of Intratumoral Reovirus Type 3 Dearing and Palliative Radiotherapy in Patients with Advanced Cancers. *Clin. Cancer Res.* *16*, 3067–3077.

Harrow, S., Papanastassiou, V., Harland, J., Mabbs, R., Petty, R., Fraser, M., Hadley, D., Patterson, J., Brown, S.M., and Rampling, R. (2004). HSV1716 injection into the brain adjacent to tumour following surgical resection of high-grade glioma: safety data and long-term survival. *Gene Ther.* *11*, 1648–1658.

- Heise, C., Sampson-Johannes, A., Williams, A., McCormick, F., Von Hoff, D.D., and Kirn, D.H. (1997). ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nat. Med.* 3, 639–645.
- Hellums, E.K., Markert, J.M., Parker, J.N., He, B., Perbal, B., Roizman, B., Whitley, R.J., Langford, C.P., Bharara, S., and Gillespie, G.Y. (2005). Increased efficacy of an interleukin-12-secreting herpes simplex virus in a syngeneic intracranial murine glioma model. *Neuro-Oncol.* 7, 213–224.
- Hnatiuk, S., Barry, M., Zeng, W., Liu, L., Lucas, A., Percy, D., and McFadden, G. (1999). Role of the C-terminal RDEL motif of the myxoma virus M-T4 protein in terms of apoptosis regulation and viral pathogenesis. *Virology* 263, 290–306.
- Hoffmann, D., and Wildner, O. (2007). Comparison of herpes simplex virus- and conditionally replicative adenovirus-based vectors for glioblastoma treatment. *Cancer Gene Ther.* 14, 627–639.
- Hohlweg, U., Hösel, M., Dorn, A., Webb, D., Hilger-Eversheim, K., Remus, R., Schmitz, B., Buettner, R., Schramme, A., Corzilius, L., *et al.* (2003). Intraperitoneal dissemination of Ad12-induced undifferentiated neuroectodermal hamster tumors: de novo methylation and transcription patterns of integrated viral and of cellular genes. *Virus Res.* 98, 45–56.
- Hoster, H.A., Zanes, R.P., and Von Haam, E. (1949). Studies in Hodgkin's syndrome; the association of viral hepatitis and Hodgkin's disease; a preliminary report. *Cancer Res.* 9, 473–480.
- Hussain, S.F., Yang, D., Suki, D., Aldape, K., Grimm, E., and Heimberger, A.B. (2006). The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses. *Neuro-Oncol.* 8, 261–279.
- Inohara, N., Ding, L., Chen, S., and Núñez, G. (1997). Harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *EMBO J.* 16, 1686–1694.
- Inoue, S., Ichikawa, T., Kurozumi, K., Maruo, T., Onishi, M., Yoshida, K., Fujii, K., Kambara, H., Chiocca, E.A., and Date, I. (2012). Novel animal glioma models that separately exhibit two different invasive and angiogenic phenotypes of human glioblastomas. *World Neurosurg.* 78, 670–682.
- Irwin, C.R., Favis, N.A., Agopsowicz, K.C., Hitt, M.M., and Evans, D.H. (2013). Myxoma virus oncolytic efficiency can be enhanced through chemical or genetic disruption of the actin cytoskeleton. *PLoS One* 8, e84134.
- Jeuken, J., van den Broecke, C., Gijzen, S., Boots-Sprenger, S., and Wesseling, P. (2007). RAS/RAF pathway activation in gliomas: the result of copy number gains rather than activating mutations. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 114, 121–133.
- Jiang, H., Gomez-Manzano, C., Alemany, R., Medrano, D., Alonso, M., Bekele, B.N., Lin, E., Conrad, C.C., Yung, W.K.A., and Fueyo, J. (2005). Comparative effect of oncolytic adenoviruses with E1A-55 kDa or E1B-55 kDa deletions in malignant gliomas. *Neoplasia N. Y.* N 7, 48–56.

- Jiang, H., Gomez-Manzano, C., Lang, F.F., Alemany, R., and Fueyo, J. (2009). Oncolytic adenovirus: preclinical and clinical studies in patients with human malignant gliomas. *Curr. Gene Ther.* *9*, 422–427.
- Johnson, D.R., Leeper, H.E., and Uhm, J.H. (2013). Glioblastoma survival in the United States improved after Food and Drug Administration approval of bevacizumab: a population-based analysis. *Cancer* *119*, 3489–3495.
- Johnston, J.B., Wang, G., Barrett, J.W., Nazarian, S.H., Colwill, K., Moran, M., and McFadden, G. (2005a). Myxoma virus M-T5 protects infected cells from the stress of cell cycle arrest through its interaction with host cell cullin-1. *J. Virol.* *79*, 10750–10763.
- Johnston, J.B., Barrett, J.W., Nazarian, S.H., Goodwin, M., Ricciuto, D., Ricuttio, D., Wang, G., and McFadden, G. (2005b). A poxvirus-encoded pyrin domain protein interacts with ASC-1 to inhibit host inflammatory and apoptotic responses to infection. *Immunity* *23*, 587–598.
- Johnston, J.B., Nazarian, S.H., Natale, R., and McFadden, G. (2005c). Myxoma virus infection of primary human fibroblasts varies with cellular age and is regulated by host interferon responses. *Virology* *332*, 235–248.
- Josiah, D.T., Zhu, D., Dreher, F., Olson, J., McFadden, G., and Caldas, H. (2010). Adipose-derived stem cells as therapeutic delivery vehicles of an oncolytic virus for glioblastoma. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *18*, 377–385.
- Kang, Y.-A., Shin, H.-C., Yoo, J.Y., Kim, J.-H., Kim, J.-S., and Yun, C.-O. (2008). Novel cancer antiangiotherapy using the VEGF promoter-targeted artificial zinc-finger protein and oncolytic adenovirus. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *16*, 1033–1040.
- Kaowinn, S., Cho, I.-R., Moon, J., Jun, S.W., Kim, C.S., Kang, H.Y., Kim, M., Koh, S.S., and Chung, Y.-H. (2015). Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor (PAUF) confers resistance to pancreatic cancer cells against oncolytic parvovirus H-1 infection through IFNA receptor-mediated signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *459*, 313–318.
- Karsy, M., Neil, J.A., Guan, J., Mahan, M.A., Colman, H., and Jensen, R.L. (2015). A practical review of prognostic correlations of molecular biomarkers in glioblastoma. *Neurosurg. Focus* *38*, E4.
- Kaufmann, J.K., and Chiocca, E.A. (2014). Glioma virus therapies between bench and bedside. *Neuro-Oncol.* *16*, 334–351.
- Kelly, E., and Russell, S.J. (2007). History of Oncolytic Viruses: Genesis to Genetic Engineering. *Mol. Ther.* *15*, 651–659.
- Kernohan, J.W., and Mabon, R.F. (1949). A simplified classification of the gliomas. *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.* *24*, 71–75.
- Kicielinski, K.P., Chiocca, E.A., Yu, J.S., Gill, G.M., Coffey, M., and Markert, J.M. (2014). Phase 1 clinical trial of intratumoral reovirus infusion for the treatment of recurrent malignant gliomas in adults. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *22*, 1056–1062.
- Kim, M. (2015). Replicating poxviruses for human cancer therapy. *J. Microbiol. Seoul Korea* *53*, 209–218.



Kleihues, P., Louis, D.N., Scheithauer, B.W., Rorke, L.B., Reifenberger, G., Burger, P.C., and Cavenee, W.K. (2002). The WHO classification of tumors of the nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *61*, 215–225; discussion 226–229.

Kleijn, A., Kloezeman, J., Treffers-Westerlaken, E., Fulci, G., Leenstra, S., Dirven, C., Debets, R., and Lamfers, M. (2014). The in vivo therapeutic efficacy of the oncolytic adenovirus Delta24-RGD is mediated by tumor-specific immunity. *PloS One* *9*, e97495.

Knipe, D.M., and Howley, P.M. (2007). *Fields' Virology*, Fifth Edition Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p2906-2981.

Koks, C.A., Garg, A.D., Ehrhardt, M., Riva, M., Vandenberk, L., Boon, L., De Vleeschouwer, S., Agostinis, P., Graf, N., and Van Gool, S.W. (2015). Newcastle disease virotherapy induces long-term survival and tumor-specific immune memory in orthotopic glioma through the induction of immunogenic cell death. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *136*, E313–E325.

Krishnamurthy, S., Takimoto, T., Scroggs, R.A., and Portner, A. (2006). Differentially regulated interferon response determines the outcome of Newcastle disease virus infection in normal and tumor cell lines. *J. Virol.* *80*, 5145–5155.

Labussière, M., Boisselier, B., Mokhtari, K., Di Stefano, A.-L., Rahimian, A., Rossetto, M., Ciccarino, P., Saulnier, O., Pattera, R., Marie, Y., *et al.* (2014). Combined analysis of TERT, EGFR, and IDH status defines distinct prognostic glioblastoma classes. *Neurology* *83*, 1200–1206.

Lal, A., Glazer, C.A., Martinson, H.M., Friedman, H.S., Archer, G.E., Sampson, J.H., and Riggins, G.J. (2002). Mutant epidermal growth factor receptor up-regulates molecular effectors of tumor invasion. *Cancer Res.* *62*, 3335–3339.

Lalani, A.S., Graham, K., Mossman, K., Rajarathnam, K., Clark-Lewis, I., Kelvin, D., and McFadden, G. (1997). The purified myxoma virus gamma interferon receptor homolog M-T7 interacts with the heparin-binding domains of chemokines. *J. Virol.* *71*, 4356–4363.

Lam, P.Y., Di Tomaso, E., Ng, H.K., Pang, J.C., Roussel, M.F., and Hjelm, N.M. (2000). Expression of p19INK4d, CDK4, CDK6 in glioblastoma multiforme. *Br. J. Neurosurg.* *14*, 28–32.

Lamb, S.A., Rahman, M.M., and McFadden, G. (2014). Recombinant myxoma virus lacking all poxvirus ankyrin-repeat proteins stimulates multiple cellular anti-viral pathways and exhibits a severe decrease in virulence. *Virology* *464-465*, 134–145.

Laurie, S.A., Bell, J.C., Atkins, H.L., Roach, J., Bamat, M.K., O'Neil, J.D., Roberts, M.S., Groene, W.S., and Lorence, R.M. (2006). A phase 1 clinical study of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, using two-step desensitization. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *12*, 2555–2562.

Law, M., Carter, G.C., Roberts, K.L., Hollinshead, M., and Smith, G.L. (2006). Ligand-induced and nonfusogenic dissolution of a viral membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 5989–5994.

Li, Q.-X., Liu, G., and Wong-Staal, F. (2008). Oncolytic virotherapy as a personalized cancer vaccine. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *123*, 493–499.

- Li, W., Li, K., Zhao, L., and Zou, H. (2014). Bioinformatics analysis reveals disturbance mechanism of MAPK signaling pathway and cell cycle in Glioblastoma multiforme. *Gene* 547, 346–350.
- Lim, J.K., Obara, C.J., Rivollier, A., Pletnev, A.G., Kelsall, B.L., and Murphy, P.M. (2011). Chemokine receptor Ccr2 is critical for monocyte accumulation and survival in West Nile virus encephalitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 471–478.
- Liu, J., Wennier, S., Zhang, L., and McFadden, G. (2011). M062 is a host range factor essential for myxoma virus pathogenesis and functions as an antagonist of host SAMD9 in human cells. *J. Virol.* 85, 3270–3282.
- Liu, J., Wennier, S., Moussatche, N., Reinhard, M., Condit, R., and McFadden, G. (2012). Myxoma virus M064 is a novel member of the poxvirus C7L superfamily of host range factors that controls the kinetics of myxomatosis in European rabbits. *J. Virol.* 86, 5371–5375.
- Lorence, R.M., Reichard, K.W., Katubig, B.B., Reyes, H.M., Phuangsab, A., Mitchell, B.R., Cascino, C.J., Walter, R.J., and Peoples, M.E. (1994). Complete regression of human neuroblastoma xenografts in athymic mice after local Newcastle disease virus therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 86, 1228–1233.
- Lorence, R.M., Roberts, M.S., O’Neil, J.D., Groene, W.S., Miller, J.A., Mueller, S.N., and Bamat, M.K. (2007). Phase 1 clinical experience using intravenous administration of PV701, an oncolytic Newcastle disease virus. *Curr. Cancer Drug Targets* 7, 157–167.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvett, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 114, 97–109.
- L Song, T.O. (2009). Reovirus infection of cancer cells is not due to activated Ras pathway. *Cancer Gene Ther.* 16, 382.
- Lun, X., Yang, W., Alain, T., Shi, Z.-Q., Muzik, H., Barrett, J.W., McFadden, G., Bell, J., Hamilton, M.G., Senger, D.L., *et al.* (2005). Myxoma virus is a novel oncolytic virus with significant antitumor activity against experimental human gliomas. *Cancer Res.* 65, 9982–9990.
- Lun, X., Alain, T., Zemp, F.J., Zhou, H., Rahman, M.M., Hamilton, M.G., McFadden, G., Bell, J., Senger, D.L., and Forsyth, P.A. (2010). Myxoma virus virotherapy for glioma in immunocompetent animal models: optimizing administration routes and synergy with rapamycin. *Cancer Res.* 70, 598–608.
- Lun, X.Q., Zhou, H., Alain, T., Sun, B., Wang, L., Barrett, J.W., Stanford, M.M., McFadden, G., Bell, J., Senger, D.L., *et al.* (2007). Targeting human medulloblastoma: oncolytic virotherapy with myxoma virus is enhanced by rapamycin. *Cancer Res.* 67, 8818–8827.
- Macen, J.L., Upton, C., Nation, N., and McFadden, G. (1993). SERP1, a serine proteinase inhibitor encoded by myxoma virus, is a secreted glycoprotein that interferes with inflammation. *Virology* 195, 348–363.
- MacNeill, A.L., Moldenhauer, T., Doty, R., and Mann, T. (2012). Myxoma virus induces apoptosis in cultured feline carcinoma cells. *Res. Vet. Sci.* 93, 1036–1038.

Madlambayan, G.J., Bartee, E., Kim, M., Rahman, M.M., Meacham, A., Scott, E.W., McFadden, G., and Cogle, C.R. (2012). Acute myeloid leukemia targeting by myxoma virus in vivo depends on cell binding but not permissiveness to infection in vitro. *Leuk. Res.* 36, 619–624.

Mansouri, M., Bartee, E., Gouveia, K., Hovey Nerenberg, B.T., Barrett, J., Thomas, L., Thomas, G., McFadden, G., and Früh, K. (2003). The PHD/LAP-Domain Protein M153R of Myxomavirus Is a Ubiquitin Ligase That Induces the Rapid Internalization and Lysosomal Destruction of CD4. *J. Virol.* 77, 1427–1440.

Mao, H., LeBrun, D.G., Yang, J., Zhu, V.F., and Li, M. (2012). Deregulated Signaling Pathways in Glioblastoma Multiforme: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets. *Cancer Invest.* 30, 48–56.

Markert, J.M., Medlock, M.D., Rabkin, S.D., Gillespie, G.Y., Todo, T., Hunter, W.D., Palmer, C.A., Feigenbaum, F., Tornatore, C., Tufaro, F., *et al.* (2000). Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther.* 7, 867–874.

Markert, J.M., Liechty, P.G., Wang, W., Gaston, S., Braz, E., Karrasch, M., Nabors, L.B., Markiewicz, M., Lakeman, A.D., Palmer, C.A., *et al.* (2009). Phase Ib Trial of Mutant Herpes Simplex Virus G207 Inoculated Pre- and Post-tumor Resection for Recurrent GBM. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 17, 199–207.

Markert, J.M., Razdan, S.N., Kuo, H.-C., Cantor, A., Knoll, A., Karrasch, M., Nabors, L.B., Markiewicz, M., Agee, B.S., Coleman, J.M., *et al.* (2014). A Phase I Trial of Oncolytic HSV-1, G207, Given in Combination With Radiation for Recurrent GBM Demonstrates Safety and Radiographic Responses. *Mol. Ther.* 22, 1048–1055.

Marlier, D., Cassart, D., Boucraut-Baralon, C., Coignoul, F., and Vindevogel, H. (1999). Experimental infection of specific pathogen-free New Zealand White rabbits with five strains of amyxomatous myxoma virus. *J. Comp. Pathol.* 121, 369–384.

Marshall, N.J., Goodwin, C.J., and Holt, S.J. (1995). A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regul.* 5, 69–84.

Martuza, R.L., Malick, A., Markert, J.M., Ruffner, K.L., and Coen, D.M. (1991). Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science* 252, 854–856.

Mastrangelo, M.J., Maguire, H.C., Eisenlohr, L.C., Laughlin, C.E., Monken, C.E., McCue, P.A., Kovatich, A.J., and Lattime, E.C. (1999). Intratumoral recombinant GM-CSF-encoding virus as gene therapy in patients with cutaneous melanoma. *Cancer Gene Ther.* 6, 409–422.

McFadden, G. (2005). Poxvirus tropism. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 201–213.

McKenzie, B.A., Zemp, F.J., Pisklakova, A., Narendran, A., McFadden, G., Lun, X., Kenchappa, R.S., Kurz, E.U., and Forsyth, P.A. (2015). In vitro screen of a small molecule inhibitor drug library identifies multiple compounds that synergize with oncolytic myxoma virus against human brain tumor-initiating cells. *Neuro-Oncol.* 17, 1086–1094.

- Messud-Petit, F., Gelfi, J., Delverdier, M., Amardeilh, M.F., Py, R., Sutter, G., and Bertagnoli, S. (1998). Serp2, an inhibitor of the interleukin-1beta-converting enzyme, is critical in the pathobiology of myxoma virus. *J. Virol.* *72*, 7830–7839.
- Miest, T.S., and Cattaneo, R. (2014). New viruses for cancer therapy: meeting clinical needs. *Nat. Rev. Microbiol.* *12*, 23–34.
- Mineta, T., Rabkin, S.D., Yazaki, T., Hunter, W.D., and Martuza, R.L. (1995). Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. *Nat. Med.* *1*, 938–943.
- Moore, A.E. (1951). Inhibition of growth of five transplantable mouse tumors by the virus of Russian Far East encephalitis. *Cancer* *4*, 375–382.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* *65*, 55–63.
- Moss, B. (2006). Poxvirus entry and membrane fusion. *Virology* *344*, 48–54.
- Mota, H.C. (1973). Infantile Hodgkin's disease: remission after measles. *Br. Med. J.* *2*, 421.
- Mustafa, Z., Shamsuddin, H.S., Ideris, A., Ibrahim, R., Jaafar, H., Ali, A.M., and Abdullah, J.M. (2013). Viability reduction and Rac1 gene downregulation of heterogeneous ex-vivo glioma acute slice infected by the oncolytic Newcastle disease virus strain V4UPM. *BioMed Res. Int.* *2013*, 248507.
- Nakada, M., Kita, D., Watanabe, T., Hayashi, Y., Teng, L., Pyko, I.V., and Hamada, J.-I. (2011). Aberrant Signaling Pathways in Glioma. *Cancers* *3*, 3242–3278.
- Nakai, T., Shand, F.L., and Howatson, A.F. (1969). Development of measles virus in vitro. *Virology* *38*, 50–67.
- Nakajima, T., and Mukai, N. (1979). Cell origin of human adenovirus type 12-induced subcutaneous tumor in Syrian hamsters. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *45*, 187–194.
- Nandi, S., Ulasov, I.V., Rolle, C.E., Han, Y., and Lesniak, M.S. (2009). A chimeric adenovirus with an Ad 3 fiber knob modification augments glioma virotherapy. *J. Gene Med.* *11*, 1005–1011.
- Ogbomo, H., Zemp, F.J., Lun, X., Zhang, J., Stack, D., Rahman, M.M., McFadden, G., Mody, C.H., and Forsyth, P.A. (2013). Myxoma virus infection promotes NK lysis of malignant gliomas in vitro and in vivo. *PloS One* *8*, e66825.
- Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2013). The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* *19*, 764–772.
- Olar, A., and Sulman, E.P. (2015). Molecular Markers in Low-Grade Glioma-Toward Tumor Reclassification. *Semin. Radiat. Oncol.* *25*, 155–163.
- Omuro A, and DeAngelis LM (2013). Glioblastoma and other malignant gliomas: A clinical review. *JAMA* *310*, 1842–1850.

- Onishi, M., Ichikawa, T., Kurozumi, K., Fujii, K., Yoshida, K., Inoue, S., Michiue, H., Chiocca, E.A., Kaur, B., and Date, I. (2013). Bimodal anti-glioma mechanisms of cilengitide demonstrated by novel invasive glioma models. *Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol.* *33*, 162–174.
- Opgenorth, A., Strayer, D., Upton, C., and McFadden, G. (1992). Deletion of the growth factor gene related to EGF and TGF alpha reduces virulence of malignant rabbit fibroma virus. *Virology* *186*, 175–191.
- Oppenlander, M.E., Wolf, A.B., Snyder, L.A., Bina, R., Wilson, J.R., Coons, S.W., Ashby, L.S., Brachman, D., Nakaji, P., Porter, R.W., *et al.* (2014). An extent of resection threshold for recurrent glioblastoma and its risk for neurological morbidity. *J. Neurosurg.* *120*, 846–853.
- Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Farah, P., Ondracek, A., Chen, Y., Wolinsky, Y., Stroup, N.E., Kruchko, C., and Barnholtz-Sloan, J.S. (2013). CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-Oncol.* *15 Suppl 2*, ii1–ii56.
- Pan, I.-W., Ferguson, S.D., and Lam, S. (2015). Patient and treatment factors associated with survival among adult glioblastoma patients: A USA population-based study from 2000-2010. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* *22*, 1575–1581.
- Papanastassiou, V., Rampling, R., Fraser, M., Petty, R., Hadley, D., Nicoll, J., Harland, J., Mabbs, R., and Brown, M. (2002). The potential for efficacy of the modified (ICP 34.5(-)) herpes simplex virus HSV1716 following intratumoural injection into human malignant glioma: a proof of principle study. *Gene Ther.* *9*, 398–406.
- Parviainen, S., Autio, K., Vähä-Koskela, M., Guse, K., Pesonen, S., Rosol, T.J., Zhao, F., and Hemminki, A. (2015). Incomplete but infectious vaccinia virions are produced in the absence of oncolysis in feline SCCF1 cells. *PLoS One* *10*, e0120496.
- Pasquinucci, G. (1971). Possible effect of measles on leukaemia. *Lancet Lond. Engl.* *1*, 136.
- Patil, C.G., Yi, A., Elramsisy, A., Hu, J., Mukherjee, D., Irvin, D.K., Yu, J.S., Bannykh, S.I., Black, K.L., and Nuño, M. (2012). Prognosis of patients with multifocal glioblastoma: a case-control study. *J. Neurosurg.* *117*, 705–711.
- Pendleton, C., Li, Q., Chesler, D.A., Yuan, K., Guerrero-Cazares, H., and Quinones-Hinojosa, A. (2013). Mesenchymal stem cells derived from adipose tissue vs bone marrow: in vitro comparison of their tropism towards gliomas. *PLoS One* *8*, e58198.
- Pozzolini, M., Scarfi, S., Benatti, U., and Giovine, M. (2003). Interference in MTT cell viability assay in activated macrophage cell line. *Anal. Biochem.* *313*, 338–341.
- Prestwich, R.J., Errington, F., Harrington, K.J., Pandha, H.S., Selby, P., and Melcher, A. (2008). Oncolytic viruses: do they have a role in anti-cancer therapy? *Clin. Med. Oncol.* *2*, 83–96.
- Puduvalli, V.K., Kyritsis, A.P., Hess, K.R., Bondy, M.L., Fuller, G.N., Kouraklis, G.P., Levin, V.A., and Bruner, J.M. (2000). Patterns of expression of Rb and p16 in astrocytic gliomas, and correlation with survival. *Int. J. Oncol.* *17*, 963–969.

- Puhlmann, J., Puehler, F., Mumberg, D., Boukamp, P., and Beier, R. (2010). Rac1 is required for oncolytic NDV replication in human cancer cells and establishes a link between tumorigenesis and sensitivity to oncolytic virus. *Oncogene* 29, 2205–2216.
- Rahman, M.M., Mohamed, M.R., Kim, M., Smallwood, S., and McFadden, G. (2009). Co-regulation of NF-kappaB and inflammasome-mediated inflammatory responses by myxoma virus pyrin domain-containing protein M013. *PLoS Pathog.* 5, e1000635.
- Rahman, M.M., Liu, J., Chan, W.M., Rothenburg, S., and McFadden, G. (2013). Myxoma virus protein M029 is a dual function immunomodulator that inhibits PKR and also conscripts RHA/DHX9 to promote expanded host tropism and viral replication. *PLoS Pathog.* 9, e1003465.
- Ramplung, R., Cruickshank, G., Papanastassiou, V., Nicoll, J., Hadley, D., Brennan, D., Petty, R., MacLean, A., Harland, J., McKie, E., *et al.* (2000). Toxicity evaluation of replication-competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma. *Gene Ther.* 7, 859–866.
- Rao, S.K., Edwards, J., Joshi, A.D., Siu, I.-M., and Riggins, G.J. (2010). A survey of glioblastoma genomic amplifications and deletions. *J. Neurooncol.* 96, 169–179.
- Roberts, M.S., Lorence, R.M., Groene, W.S., and Bamat, M.K. (2006). Naturally oncolytic viruses. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 8, 314–321.
- Rothmann, T., Hengstermann, A., Whitaker, N.J., Scheffner, M., and zur Hausen, H. (1998). Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *J. Virol.* 72, 9470–9478.
- Rudà, R., Bello, L., Duffau, H., and Soffietti, R. (2012). Seizures in low-grade gliomas: natural history, pathogenesis, and outcome after treatments. *Neuro-Oncol.* 14, iv55–iv64.
- Sanai, N., Polley, M.-Y., McDermott, M.W., Parsa, A.T., and Berger, M.S. (2011). An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas. *J. Neurosurg.* 115, 3–8.
- Sarkaria, J.N., Carlson, B.L., Schroeder, M.A., Grogan, P., Brown, P.D., Giannini, C., Ballman, K.V., Kitange, G.J., Guha, A., Pandita, A., *et al.* (2006). Use of an orthotopic xenograft model for assessing the effect of epidermal growth factor receptor amplification on glioblastoma radiation response. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 12, 2264–2271.
- Schirmacher, V., and Fournier, P. (2014). Multimodal cancer therapy involving oncolytic newcastle disease virus, autologous immune cells, and bi-specific antibodies. *Front. Oncol.* 4, 224.
- Schreiber, M., Sedger, L., and McFadden, G. (1997). Distinct domains of M-T2, the myxoma virus tumor necrosis factor (TNF) receptor homolog, mediate extracellular TNF binding and intracellular apoptosis inhibition. *J. Virol.* 71, 2171–2181.
- Scott, J.V., and Chopin, P.W. (1982). Enhanced yields of measles virus from cultured cells. *J. Virol. Methods* 5, 173–179.
- Sedger, L.M., Osvath, S.R., Xu, X.-M., Li, G., Chan, F.K.-M., Barrett, J.W., and McFadden, G. (2006). Poxvirus tumor necrosis factor receptor (TNFR)-like T2 proteins contain a

conserved preligand assembly domain that inhibits cellular TNFR1-induced cell death. *J. Virol.* *80*, 9300–9309.

Seet, B.T., Barrett, J., Robichaud, J., Shilton, B., Singh, R., and McFadden, G. (2001). Glycosaminoglycan binding properties of the myxoma virus CC-chemokine inhibitor, M-T1. *J. Biol. Chem.* *276*, 30504–30513.

Senkevich, T.G., Ojeda, S., Townsley, A., Nelson, G.E., and Moss, B. (2005). Poxvirus multiprotein entry–fusion complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 18572–18577.

Shen, Y., and Nemunaitis, J. (2006). Herpes simplex virus 1 (HSV-1) for cancer treatment. *Cancer Gene Ther.* *13*, 975–992.

Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* *432*, 396–401.

Sinkovics, J.G., and Horvath, J.C. (2000). Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* *16*, 1–15.

Spiesschaert, B., McFadden, G., Hermans, K., Nauwynck, H., and Van de Walle, G.R. (2011). The current status and future directions of myxoma virus, a master in immune evasion. *Vet. Res.* *42*, 76.

Stanford, M.M., McFadden, G., Karupiah, G., and Chaudhri, G. (2007a). Immunopathogenesis of poxvirus infections: forecasting the impending storm. *Immunol. Cell Biol.* *85*, 93–102.

Stanford, M.M., Barrett, J.W., Nazarian, S.H., Werden, S., and McFadden, G. (2007b). Oncolytic virotherapy synergism with signaling inhibitors: Rapamycin increases myxoma virus tropism for human tumor cells. *J. Virol.* *81*, 1251–1260.

Stanford, M.M., Werden, S.J., and McFadden, G. (2007c). Myxoma virus in the European rabbit: interactions between the virus and its susceptible host. *Vet. Res.* *38*, 299–318.

Stepanenko, A.A., and Dmitrenko, V.V. (2015). Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene*. Ahead to print

Stoica, G., Kim, H.-T., Hall, D.G., and Coates, J.R. (2004). Morphology, immunohistochemistry, and genetic alterations in dog astrocytomas. *Vet. Pathol.* *41*, 10–19.

Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., *et al.* (2005). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* *352*, 987–996.

Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J.B., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., *et al.* (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* *10*, 459–466.

Suzuki, K., Fueyo, J., Krasnykh, V., Reynolds, P.N., Curiel, D.T., and Alemany, R. (2001). A conditionally replicative adenovirus with enhanced infectivity shows improved oncolytic potency. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 7, 120–126.

Sze, D.Y., Reid, T.R., and Rose, S.C. (2013). Oncolytic virotherapy. *J. Vasc. Interv. Radiol. JVIR* 24, 1115–1122.

Tanaka, M., Ino, Y., Nakagawa, K., Tago, M., and Todo, T. (2005). High-dose conformal radiotherapy for supratentorial malignant glioma: a historical comparison. *Lancet Oncol.* 6, 953–960.

Thuy, M.N.T., Kam, J.K.T., Lee, G.C.Y., Tao, P.L., Ling, D.Q., Cheng, M., Goh, S.K., Papachristos, A.J., Shukla, L., Wall, K.-L., *et al.* (2015). A novel literature-based approach to identify genetic and molecular predictors of survival in glioblastoma multiforme: Analysis of 14,678 patients using systematic review and meta-analytical tools. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* 22, 785–799.

Timiryasova, T.M., Li, J., Chen, B., Chong, D., Langridge, W.H., Gridley, D.S., and Fodor, I. (1999). Antitumor effect of vaccinia virus in glioma model. *Oncol. Res.* 11, 133–144.

Tini, P., Cerase, A., Cevenini, G., Carbone, S.F., Miracco, C., and Pirtoli, L. (2015). Epidermal Growth Factor Receptor Expression May Correlate with Survival Through Clinical and Radiological Features of Aggressiveness in Glioblastoma Treated with Radiochemotherapy. *Anticancer Res.* 35, 4117–4124.

Todo, T. (2008). “Armed” oncolytic herpes simplex viruses for brain tumor therapy. *Cell Adhes. Migr.* 2, 208–213.

Todo, T., Rabkin, S.D., and Martuza, R.L. (2000). Evaluation of ganciclovir-mediated enhancement of the antitumoral effect in oncolytic, multimutated herpes simplex virus type 1 (G207) therapy of brain tumors. *Cancer Gene Ther.* 7, 939–946.

Todo, T., Martuza, R.L., Rabkin, S.D., and Johnson, P.A. (2001). Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 6396–6401.

Top, S. (2012). Le virus myxomateux, vecteur vaccinal chez les ruminants : application à la bluetongue (Thèse d'université - Toulouse 3).

Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., and Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* 65, 87–108.

Tosic, V., Thomas, D.L., Kranz, D.M., Liu, J., McFadden, G., Shisler, J.L., MacNeill, A.L., and Roy, E.J. (2014). Myxoma virus expressing a fusion protein of interleukin-15 (IL15) and IL15 receptor alpha has enhanced antitumor activity. *PloS One* 9, e109801.

Townsley, A.C., Weisberg, A.S., Wagenaar, T.R., and Moss, B. (2006). Vaccinia virus entry into cells via a low-pH-dependent endosomal pathway. *J. Virol.* 80, 8899–8908.

Turner, G.S. (1982). Jenner’s smallpox vaccine-the riddle of vaccinia, virus and its origin by Derrick Baxby, Heineman Educational Books Ltd., *Immunol. Today* 3, 26.



- Udem, S.A. (1984). Measles virus: conditions for the propagation and purification of infectious virus in high yield. *J. Virol. Methods* 8, 123–136.
- Ueki, K., Ono, Y., Henson, J.W., Efird, J.T., von Deimling, A., and Louis, D.N. (1996). CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res.* 56, 150–153.
- Ulasov, I.V., Borovjagin, A.V., Schroeder, B.A., and Baryshnikov, A.Y. (2014). Oncolytic adenoviruses: A thorny path to glioma cure. *Genes Dis.* 1, 214–226.
- Urbasic, A.S., Hynes, S., Somrak, A., Contakos, S., Rahman, M.M., Liu, J., and MacNeill, A.L. (2012). Oncolysis of canine tumor cells by myxoma virus lacking the *serp2* gene. *Am. J. Vet. Res.* 73, 1252–1261.
- Vähä-Koskela, M.J.V., Le Boeuf, F., Lemay, C., De Silva, N., Diallo, J.-S., Cox, J., Becker, M., Choi, Y., Ananth, A., Sellers, C., *et al.* (2013). Resistance to two heterologous neurotropic oncolytic viruses, Semliki Forest virus and vaccinia virus, in experimental glioma. *J. Virol.* 87, 2363–2366.
- Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., *et al.* (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17, 98–110.
- Verpooten, D., Feng, Z., Valyi-Nagy, T., Ma, Y., Jin, H., Yan, Z., Zhang, C., Cao, Y., and He, B. (2009). Dephosphorylation of eIF2 $\alpha$  mediated by the gamma134.5 protein of herpes simplex virus 1 facilitates viral neuroinvasion. *J. Virol.* 83, 12626–12630.
- Vigneswaran, K., Neill, S., and Hadjipanayis, C.G. (2015). Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification. *Ann. Transl. Med.* 3, 95.
- Villà, S., Balañà, C., and Comas, S. (2014). Radiation and concomitant chemotherapy for patients with glioblastoma multiforme. *Chin. J. Cancer* 33, 25–31.
- Wagner, S., Csatory, C.M., Gosztonyi, G., Koch, H.-C., Hartmann, C., Peters, O., Hernáiz-Driever, P., Théallier-Janko, A., Zintl, F., Längler, A., *et al.* (2006). Combined treatment of pediatric high-grade glioma with the oncolytic viral strain MTH-68/H and oral valproic acid. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 114, 731–743.
- Wang, F., Ma, Y., Barrett, J.W., Gao, X., Loh, J., Barton, E., Virgin, H.W., and McFadden, G. (2004). Disruption of Erk-dependent type I interferon induction breaks the myxoma virus species barrier. *Nat. Immunol.* 5, 1266–1274.
- Wang, F., Barrett, J.W., Ma, Y., Dekaban, G.A., and McFadden, G. (2009). Induction of alpha/beta interferon by myxoma virus is selectively abrogated when primary mouse embryo fibroblasts become immortalized. *J. Virol.* 83, 5928–5932.
- Wang, G., Barrett, J.W., Stanford, M., Werden, S.J., Johnston, J.B., Gao, X., Sun, M., Cheng, J.Q., and McFadden, G. (2006). Infection of human cancer cells with myxoma virus requires Akt activation via interaction with a viral ankyrin-repeat host range factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4640–4645.

- Wang, Y.X., Turner, P.C., Ness, T.L., Moon, K.B., Schoeb, T.R., and Moyer, R.W. (2000). The cowpox virus SPI-3 and myxoma virus SERP1 serpins are not functionally interchangeable despite their similar proteinase inhibition profiles in vitro. *Virology* 272, 281–292.
- Weng, M., Gong, W., Ma, M., Chu, B., Qin, Y., Zhang, M., Lun, X., McFadden, G., Forsyth, P., Yang, Y., *et al.* (2014). Targeting gallbladder cancer: oncolytic virotherapy with myxoma virus is enhanced by rapamycin in vitro and further improved by hyaluronan in vivo. *Mol. Cancer* 13, 82.
- Wennier, S.T., Liu, J., Li, S., Rahman, M.M., Mona, M., and McFadden, G. (2012). Myxoma virus sensitizes cancer cells to gemcitabine and is an effective oncolytic virotherapeutic in models of disseminated pancreatic cancer. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 20, 759–768.
- Werden, S.J., and McFadden, G. (2008). The role of cell signaling in poxvirus tropism: the case of the M-T5 host range protein of myxoma virus. *Biochim. Biophys. Acta* 1784, 228–237.
- Westcott, M.M., Liu, J., Rajani, K., D’Agostino, R., Lyles, D.S., and Porosnicu, M. (2015). Interferon Beta and Interferon Alpha 2a Differentially Protect Head and Neck Cancer Cells from Vesicular Stomatitis Virus-Induced Oncolysis. *J. Virol.* 89, 7944–7954.
- Westermarck, B. (2014). Platelet-derived growth factor in glioblastoma—driver or biomarker? *Ups. J. Med. Sci.* 119, 298–305.
- Wilcox, M.E., Yang, W., Senger, D., Rewcastle, N.B., Morris, D.G., Brasher, P.M., Shi, Z.Q., Johnston, R.N., Nishikawa, S., Lee, P.W., *et al.* (2001). Reovirus as an oncolytic agent against experimental human malignant gliomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 903–912.
- Woehrer, A., Bauchet, L., and Barnholtz-Sloan, J.S. (2014). Glioblastoma survival: has it improved? Evidence from population-based studies. *Curr. Opin. Neurol.* 27, 666–674.
- Wollmann, G., Ozduman, K., and van den Pol, A.N. (2012). Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. *Cancer J. Sudbury Mass* 18, 69–81.
- Yaacov, B., Eliahoo, E., Elihoo, E., Lazar, I., Ben-Shlomo, M., Greenbaum, I., Panet, A., and Zakay-Rones, Z. (2008). Selective oncolytic effect of an attenuated Newcastle disease virus (NDV-HUJ) in lung tumors. *Cancer Gene Ther.* 15, 795–807.
- Yamada, Y., Kimura, H., Morishima, T., Daikoku, T., Maeno, K., and Nishiyama, Y. (1991). The pathogenicity of ribonucleotide reductase-null mutants of herpes simplex virus type 1 in mice. *J. Infect. Dis.* 164, 1091–1097.
- Yang, W.Q., Lun, X., Palmer, C.A., Wilcox, M.E., Muzik, H., Shi, Z.Q., Dyck, R., Coffey, M., Thompson, B., Hamilton, M., *et al.* (2004). Efficacy and safety evaluation of human reovirus type 3 in immunocompetent animals: racine and nonhuman primates. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 10, 8561–8576.
- Yohn, D.S., Hammon, W.M., Atchison, R.W., and Casto, B.C. (1968). Oncolytic potentials of nonhuman viruses for human cancer. II. Effects of five viruses on heterotransplantable human tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 41, 523–529.

Yoon, A.-R., Hong, J., and Yun, C.-O. (2015). A vesicular stomatitis virus glycoprotein epitope-incorporated oncolytic adenovirus overcomes CAR-dependency and shows markedly enhanced cancer cell killing and suppression of tumor growth. *Oncotarget*.

Yoshida, G.J., and Saya, H. (2015). Therapeutic Strategies Targeting Cancer Stem Cells. *Cancer Sci*.

Young, R.M., Jamshidi, A., Davis, G., and Sherman, J.H. (2015). Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. *Ann. Transl. Med.* 3, 121.

Zemp, F.J. (2013). Myxoma Virus Therapy of Malignant Gliomas in Murine Syngeneic Models: Translating Barriers to Therapy. Thesis. University of Calgary.

Zemp, F.J., Lun, X., McKenzie, B.A., Zhou, H., Maxwell, L., Sun, B., Kelly, J.J.P., Stechishin, O., Luchman, A., Weiss, S., *et al.* (2013a). Treating brain tumor-initiating cells using a combination of myxoma virus and rapamycin. *Neuro-Oncol.* 15, 904–920.

Zemp, F.J., McKenzie, B.A., Lun, X., Maxwell, L., Reilly, K.M., McFadden, G., Yong, V.W., and Forsyth, P.A. (2013b). Resistance to oncolytic myxoma virus therapy in *nfl(-)/trp53(-)* syngeneic mouse glioma models is independent of anti-viral type-I interferon. *PloS One* 8, e65801.

Zemp, F.J., McKenzie, B.A., Lun, X., Reilly, K.M., McFadden, G., Yong, V.W., and Forsyth, P.A. (2014). Cellular factors promoting resistance to effective treatment of glioma with oncolytic myxoma virus. *Cancer Res.* 74, 7260–7273.

Zhang, J., Chen, T., Mao, Q., Lin, J., Jia, J., Li, S., Xiong, W., Lin, Y., Liu, Z., Liu, X., *et al.* (2015). PDGFR- $\beta$ -activated ACK1-AKT signaling promotes glioma tumorigenesis. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 136, 1769–1780.

Zulkifli, M.M., Ibrahim, R., Ali, A.M., Aini, I., Jaafar, H., Hilda, S.S., Alitheen, N.B., and Abdullah, J.M. (2009). Newcastle diseases virus strain V4UPM displayed oncolytic ability against experimental human malignant glioma. *Neurol. Res.* 31, 3–10.

# Utilisation du virus myxomateux dans le traitement des gliomes : étude du modèle chien

Jean-Benoît Tanis

## Résumé

Les gliomes sont des tumeurs du système nerveux central qui présentent souvent un mauvais pronostic. La recherche de nouveaux agents thérapeutiques comme les virus oncolytiques est une priorité : le virus myxomateux (MYXV) semble digne d'intérêt. L'utilisation d'un modèle animal pertinent permettrait d'améliorer la congruence entre la recherche préclinique et les essais cliniques sur l'Homme. Cette étude vise à connaître l'efficacité du MYXV sur les gliomes canins afin de confirmer l'intérêt du modèle chien. Deux souches de MYXV ont été utilisées: une souche de terrain (T1) et une souche vaccinale SG33. Nous avons infecté plusieurs lignées cellulaires de gliomes canins et remarqué l'efficacité de la souche SG33. En effet, bien que toutes les lignées ne soient pas permissives, sa pénétration ainsi que son effet lytique sont nettement supérieurs à ceux de la souche T1. La mortalité engendrée par l'infection est, de plus, différente selon les lignées. Les niveaux d'Akt phosphorylé peuvent expliquer une partie de cette variabilité. Ces résultats soulignent alors l'intérêt du modèle chien et font du virus SG33 un candidat intéressant dans la virothérapie des gliomes.

**Mots clés :** Virus myxomateux, Virus oncolytique, Gliomes, Modèle chien

## Abstract

Gliomas are central nervous system tumors which often harbour a very poor prognosis. As a result, finding new therapeutic agents like oncolytic viruses is mandatory. Myxoma virus (MYXV) could be a valuable candidate. Moreover, using a relevant animal model is indispensable to increase congruence between preclinical and clinical trials. Our study aims at knowing MYXV efficacy as an oncolytic virus against canine gliomas and at assessing the relevance of the canine model. We focused on two MYXV strains: T1 which is a wild-type strain and SG33 which is an innocuous vaccine strain. We infected various canine glioma cell lines with these two MYXV strains and found that SG33 seemed to be more efficient because of its higher penetrance and cytotoxic effect. Permissivity varies from one cell line to another. MYXV-mediated cytotoxicity is different according to the cell line. The amount of phosphorylated Akt could explain some of these differences. These results highlight the relevance of the canine model and shed the light on the SG33 strains as an interesting therapeutic agent against gliomas.

**Key words:** Myxoma virus, Oncolytic virus, Glioma, Canine model