

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
CENTRE INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

Immunomodulation thérapeutique dans un modèle de mélanome :

**Potentiel de mutants du virus de la stomatite vésiculaire
et influence du système du complément**

Par

Valérie Janelle

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Philosophiae doctor (Ph.D.) en **Immunologie et virologie**

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne

Dre Pascale Duplay
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Dr. Étienne Gagnon
Institut de recherche en immunologie et en
cancérologie

Examineur externe

Dr. Guy Lemay
Université de Montréal

Directeur de recherche

Dr. Alain Lamarre
INRS-Institut Armand-Frappier

Co-directeur de recherche

Dr. Laurent Poliquin
Université du Québec à Montréal

« The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not 'Eureka!' but 'That's funny...' »

- Isaac Asimov

RÉSUMÉ

Le cancer est une maladie multifactorielle difficile à traiter. En effet, les cellules tumorales ont acquis des mutations leur permettant entre autres de s'évader du système immunitaire. Cette tolérance immunitaire est alors extrêmement complexe à briser. La virothérapie oncolytique est un moyen de plus en plus étudié dans le but d'induire un état pro-inflammatoire au site tumoral en lysant les cellules cancéreuses. Ceci permet alors la reconnaissance d'antigènes tumoraux en présence des signaux d'activation adéquats afin de monter une réponse immunitaire antitumorale. L'objectif global de ce projet est de caractériser l'immunomodulation thérapeutique induite par divers mutants du virus de la stomatite vésiculaire et déterminer comment potentialiser la reconnaissance de cellules cancéreuses par le système immunitaire dans le modèle de mélanome murin B16gp33. Afin de permettre l'étude des mécanismes immunitaires impliqués lors de l'oncolyse virale, nous avons caractérisé différents mutants de la glycoprotéine d'enveloppe et de la protéine de la matrice du VSV ayant des propriétés oncolytiques diverses sur le mélanome. Nous avons ensuite pu établir que les virus plus cytopathiques induisent une meilleure réponse immunitaire contre l'épitope exogène gp33 tandis que le mutant atténué M_{MS1R} permet un bris de tolérance plus large avec l'établissement d'une réponse immunitaire contre des antigènes tumoraux variés. Nous avons également démontré que, bien que n'influençant pas la virothérapie, une inhibition transitoire du système du complément contribue à une immunomodulation antitumorale via l'action des cellules NK. Ce projet de thèse met donc en relief la possibilité d'influencer le système immunitaire à reconnaître à nouveau les cellules tumorales soit par l'action d'agents dynamiques comme le VSV ou en ciblant directement des intervenants du système immunitaire.

Mots-clés : Cancer, VSV, immunité antitumorale, complément

ABSTRACT

Cancer is a multifactorial disease difficult to treat. Indeed, tumor cells have acquired mutations allowing them, among other things, to evade from the immune system. This immune tolerance is then extremely hard to break. Oncolytic virotherapy is a way increasingly studied in order to induce a pro-inflammatory state at the tumor site by lysing cancer cells. This allows the recognition of tumor antigens in the presence of appropriate activation signals to mount an antitumor immune response. The overall objective of this project is to characterize the therapeutic immunomodulation induced by various mutants of vesicular stomatitis virus and how to potentiate the recognition of cancer cells by the immune system in the murine melanoma model B16gp33. To enable the study of immune mechanisms involved in viral oncolysis, we characterized different mutants of the envelope glycoprotein and the matrix protein of VSV which have various oncolytic properties in melanoma cells. We then established that cytopathic viruses induce a better immune response against the gp33 exogenous epitope while the attenuated mutant M_{M51R} allows a wider tolerance break with the establishment of an immune response against a variety of tumor antigens. We also demonstrated that, although not influencing virotherapy, a transient inhibition of the complement system contributes to antitumor immunomodulation through the action of NK cells. Globally, this thesis focuses on the ability to influence the immune system to recognize tumor cells by the action of active agents such as VSV or by directly targeting players of the immune system.

Keywords : Cancer, VSV, antitumor immunity, complement

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier mon premier mentor, Laurent, qui m'a fait découvrir la recherche et a fait naître en moi la passion de la conquête de la connaissance. Eh oui, j'avais dit : « Je peux faire le café et passer le balai si ça peut me permettre de graviter dans le labo et voir comment ça marche » ! Tu m'as heureusement donné plus que ça! Tu m'as permis de découvrir ce que c'est que de faire de la recherche et partager son savoir. Tu as été une source d'inspiration, un collègue et un ami. Merci Laurent.

Je voudrais aussi remercier mon deuxième mentor, Alain. Je me souviendrai toujours de notre première rencontre où je te racontais mes grandes aspirations en voulant te convaincre que ton laboratoire pourrait avoir une branche en viro-onco! Et la joie de voir que tu avais l'air tout aussi enthousiaste! Tu auras su garder ma passion bien vivante malgré les hauts et les bas et surtout, me donner la petite tape dans le dos quand j'en ai eu besoin. Merci d'avoir cru en moi Alain.

Je voudrais également ne pas passer sous silence tous mes confrères et consoeurs qui ont traversé ma route et m'ont influencé d'une façon ou d'une autre. Vous avez tous été pour moi des alliés, des amis, des confidents. Les nombreuses discussions que j'ai pu avoir avec chacun de vous pour éclairer mes décisions ou juste relâcher la pression auront été des moments privilégiés pour moi. Merci à tous!

Je tiens aussi à remercier spécialement ma famille. Mes parents, Linda et François, pour y avoir cru dès le début et m'avoir toujours soutenu. Mon frère Simon pour ton aide aussi appréciée qu'inattendue! Michèle et André pour nous avoir « adoptés » comme de vrais parents! Mamie pour t'intéresser à tout ce que je fais! Ma belle-famille : Lise, Jean-Jacques,

Yan, Josée et notre Ti-Pou Liam qui constituent pour moi une deuxième famille réconfortante qui m'a toujours épaulée. Merci!

Finalement, je tiens à remercier du fond du cœur mon meilleur ami, mon amour, mon mari : Maxim. Sans toi je ne serais pas qui je suis. Tu as su m'écouter quand j'avais besoin de me libérer, me conseiller quand j'étais perdue, me soutenir quand j'étais chambranlante et partager avec moi mes succès comme mes défaites. Tu as surtout eu la patience de passer au travers tout avec moi. Cette thèse, je te la dédie. Merci pour ce que tu es et qui nous sommes.

Valérie

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Abstract	iv
Remerciements	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Liste des abréviations	xii
Introduction	1
1. Le cancer	2
1.1 Tumorogénèse.....	2
1.1.1 Résistance à l'apoptose, prolifération non contrôlée.....	3
1.1.2 Perte de sénescence.....	4
1.1.3 Angiogenèse.....	4
1.1.4 Génération de métastases.....	5
1.2 Microenvironnement tumoral.....	5
1.2.1 Fibroblastes associés aux tumeurs.....	8
1.2.2 Macrophages associés aux tumeurs.....	8
1.2.3 Cellules myéloïdes suppressives.....	9
1.2.4 Cellules souches mésenchymateuses.....	10
1.2.5 Cellules souches cancéreuses.....	10
2. Rôles du système immunitaire	11
2.1 Immunosurveillance.....	11
2.2 Immunoédition.....	12
2.2.1 Élimination.....	12
2.2.2 Équilibre.....	14
2.2.3 Évasion.....	14
2.3 Réponse aux infections virales aiguës.....	17
2.3.1 Mécanismes de défense cellulaires.....	18
2.3.2 Mécanismes de défense systémiques.....	20
2.4 Le système du complément.....	21
2.4.1 Rôles du complément dans le contrôle des infections virales.....	23
2.4.2 Rôles du complément dans le cancer.....	25
3. Les virus oncolytiques	28
3.1 Historique de l'oncolyse virale.....	28
3.2 La sélectivité tumorale.....	29
3.2.1 Voies de signalisation p53/RB.....	30
3.2.2 Voie de signalisation de l'interféron.....	31
3.2.3 Voie de signalisation de la protéine kinase R.....	32
3.2.4 Voie de signalisation du récepteur au facteur de croissance/Ras.....	32
3.3 La grande variété d'agents viraux.....	33
3.3.1 Les adénovirus.....	33
3.3.2 Les virus herpès.....	34
3.3.3 Les poxvirus.....	35
3.3.4 Les réovirus.....	35

3.3.5 Les orthomyxovirus	36
3.3.6 Les paramyxovirus	37
3.3.7 Les rhabdovirus.....	38
3.3.7.1 Article 1. « Le virus de la stomatite vésiculaire dans la lutte contre le cancer » (Med Sci (Paris). 2013; 29 : 175-82.).....	41
4. Hypothèse et objectifs	65
Résultats.....	67
1. Caractérisation du potentiel oncolytique <i>in vitro</i> de mutants du virus de la stomatite vésiculaire.	68
1.1 Article 2. « Mutations in the glycoprotein of vesicular stomatitis virus affect cytopathogenicity : Potential for oncolytic virotherapy » (<i>J Virol.</i> 2011; 85 : 6513-20).	69
2. Caractérisation du potentiel immunomodulateur de mutants du virus de la stomatite vésiculaire dans le traitement du mélanome murin.....	101
2.1 Article 3. « The strength of the T cell response against a surrogate tumor antigen induced by oncolytic VSV therapy does not correlate with tumor control. » (Soumis à <i>Molecular Therapy</i>).....	102
3. Influence du système du complément dans le contrôle tumoral.....	136
3.1 Article 4. « Transient complement inhibition promotes a tumor-specific immune response through the implication of natural killer cells. » (<i>Cancer Immunol Res.</i> 2013; 10.1158/2326-6066.CIR-13-0173).....	137
Discussion.....	162
Conclusion	178
Références	182

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Fonctions des différentes cellules retrouvées dans le microenvironnement tumoral. Adapté de (Joyce and Pollard, 2009).	7
Tableau 2. Mécanismes d'immunoévasion des tumeurs. Adapté de (LaHeru and HJaffee, 2007).	16
Tableau 3. Contributions spécifiques de certaines protéines du complément au phénomène néoplasique. Adapté de (Rutkowski et al., 2010c).	27
Tableau 4. Récapitulation des caractéristiques principales des mutants de VSV utilisés en vue d'étude de virothérapie oncolytique.	169

LISTE DES FIGURES

- Figure 1. Altérations des voies de signalisation de la survie et de la prolifération dans les cellules cancéreuses.** Lors de la liaison des facteurs de croissance sur leur récepteur, les voies Ras ou PI3K peuvent être activés. La première mènera vers des signaux de prolifération tandis que la deuxième favorisera plutôt la survie. Plusieurs protéines intermédiaires peuvent, si mutées, profiter aux cellules cancéreuses. Adapté de (Francoz et al., 2012).....3
- Figure 2. Concept de l'immunoédition du cancer.** L'immunoédition du cancer passe par trois phases majeures soit la phase d'élimination, d'équilibre puis d'évasion. Ces dernières sont modulées en fonctions des cellules immunitaires infiltrantes, des cytokines sécrétées et de l'accumulation de mutations au sein des cellules tumorales. Adapté de (Schreiber et al., 2011). 13
- Figure 3. Cascade d'activation du complément.** La cascade du complément peut être activée selon trois voies soit la voie classique, des lectines ou encore alterne. Plusieurs facteurs requis diffèrent dans chacune des voies, mais toutes convergent vers l'activation de la molécule C3. Tiré de (Peffault de Latour et al., 2010).23
- Figure 4. Historique de l'oncolyse virale.** Le concept d'oncolyse virale est né tout d'abord d'après les observations cliniques de régressions spontanées de cancer suite à des infections (encadrés orangés) (Bierman, 1953; Bluming and Ziegler, 1971; Dock, 1904; Gross, 1971; Pasquinucci, 1971; Taqi, 1981) ou une vaccination (encadrés rouges) (DePace, 1912; Greentree, 1983; Hansen and Libnoch, 1978; Schattner, 1984). Dans les années 50, les expérimentations à base de virus en vue de thérapie oncolytique ont vu le jour (encadrés bleus). Vinrent ensuite les traitements dits de deuxième génération utilisant des virus modifiés génétiquement afin d'accroître leur sélectivité envers les cellules tumorales (encadré mauve), puis les traitements de troisième génération avec des virus sélectifs armés, pouvant alors délivrer des gènes d'intérêts (encadré vert). Adapté de (Liu et al., 2007).....29
- Figure 5. Interaction de certains virus oncolytiques avec le métabolisme cellulaire.** Intervention de divers virus avec les voies cellulaires de l'apoptose, la signalisation par l'interféron et EGFR/Ras. Adapté de (Guo et al., 2008). Abréviations : Apaf-1, Apoptotic peptidase activating factor 1; Bak, Bcl-2 homologous antagonist killer; Bax, Bcl-2-associated X protein; Bcl-2, B-cell lymphoma-2 ; Bid, BH3 interacting-domain death agonist; Casp-9, caspase-9; Cyto-C, cytochrome c; eIF-2 α , Eukaryotic translation initiation factor 2 α ; EGFR, Epidermal growth factor receptor; FADD, Fas-Associated protein with Death Domain; GF, growth factor; IAPs, Inhibitors of apoptosis; IFNs, Interférons; IFN-R, récepteur à l'interféron; NDV, Newcastle disease virus; PKR, protéine kinase R; tBid, Bid tronqué; TRAIL-Rs, récepteurs du tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand; VSV, Vesicular stomatitis virus.30

Figure 6. Hypothèses pouvant expliquer la sécrétion d'interféron de type I par les mutants de G. 1) Implication possible des mutants de G du VSV dans la phosphorylation de I κ B α pour induire sa dégradation ou de la sous-unité p65 de NF- κ B pour sa translocation au noyau. 2) Implication possible de G_{6R} dans la phosphorylation de IRF-3 pour son homodimérisation ou l'hétérodimérisation avec IRF-7 permettant alors la transcription de gènes tels que l'interféron- β . 3) Interaction possible de G_{6R} avec la protéine de la matrice, séquestrant cette dernière et limitant sa liaison avec NUP98. 165

Figure 7. Récapitulation des mécanismes immunitaires engendrés par le traitement oncolytique à base des différents mutants de VSV. 1) Le VSV est rapidement contrôlé et éliminé par les anticorps neutralisants. 2) Une infiltration lymphocytaire suit l'infection virale. 3) Une activation de cellules présentatrices d'antigène doit avoir lieu, bien que sous la limite de détection, puisqu'une réponse immunitaire antitumorale est générée. 4) Cela mène à l'activation des lymphocytes T. 5-6) Des lymphocytes T CD8⁺ gp33-spécifiques fonctionnels et cytotoxiques sont induits pour les souches sauvage, G₆ et G_{6R}. La souche M_{M51R} induit peu de CTL contre l'épitope gp33, mais est tout de même efficace à induire des CTL antitumoraux. Cela entraîne la prolongation de la survie de tous les animaux traités. Adapté de (El Hage et al., 2008). 180

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
Apaf-1	<i>Apoptotic peptidase activating factor 1</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
BAD	<i>Bcl-cL/bcl-2-associated death promoter</i>
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>
Bid	<i>BH3 interacting-domain death agonist</i>
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
Casp-9	Caspase-9
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
CDK	<i>Cyclin-dependant kinase</i>
Cyto-C	Cytochrome c
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CSC	Cellules souches cancéreuses
CSF1	<i>Colony stimulating factor 1</i>
CREB	<i>C-AMP Response Element-binding</i>
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte antigen-4</i>
DAF	<i>Decay-accelerating factor</i>
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DCs	<i>Dendritic cells</i>
EGR	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
eIF-2 α	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2 α</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FADD	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>

G	Glycoprotéine d'enveloppe
GF	<i>Growth factor</i>
FasL	<i>Fas ligand</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
IDO	Indolamine 2,3-dioxygénase
IAPs	<i>Inhibitors of apoptosis</i>
IFNs	Interférons
IFNAR	Récepteur à l'interféron
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IGFBP	<i>Insuline-like growth factor binding protein</i>
IgG	Immunoglobuline G
IgM	Immunoglobuline M
IL	Interleukine
IRSE	<i>Interferon-responsive sequence element</i>
ISG	<i>Interferon-stimulated gene</i>
ISGF3	<i>Interferon-stimulated gene factor 3</i>
JAK-STAT	<i>Janus activated kinase-signal transducer and activated transcription</i>
JNK	<i>c-jun amino terminal kinase</i>
L	Polymérase
LCMV	<i>Lymphocytic choriomeningitidis virus</i>
LDLR	<i>Low-density lipoprotein receptor</i>
M	Matrice
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MBL	<i>Mannose-binding protein</i>
MDA5	<i>Melanoma Differentiation-Associated protein 5</i>
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MSC	<i>Mesenchymal stem cell</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MV-CEA	<i>Measle virus-carcinoembryonic antigen</i>

MV-NIS	<i>Measle virus-thyroidal sodium iodide symporter</i>
N	Nucléocapside
NDV	<i>Newcastle disease virus</i>
NK	<i>Natural killer</i>
P	Phosphoprotéine
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PD-1	<i>Programmed cell death-1</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PD-L1	<i>Programmed cell death ligand-1</i>
PKC	Protéine kinase C
PKR	Protéine kinase R
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene 1</i>
RSV	<i>Respiratory syncytial virus</i>
TAP	<i>Transporter associated with antigen processing</i>
TAM	<i>Tumor-associated macrophages</i>
tBid	Bid tronqué
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
TRAIL-Rs	Récepteurs du <i>tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand</i>
Treg	T régulateur
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VHS-1	Virus de l'herpès simplex-1
VSV	Virus de la stomatite vésiculaire

INTRODUCTION

1. Le cancer

Le Canada est l'un des rares pays à s'être doté d'un système de registres du cancer qui permet de surveiller et de comparer les tendances relatives au cancer dans toute la population. Toutes les heures, chaque jour, en moyenne 21 personnes recevront un diagnostic de cancer et 9 personnes mourront de cette maladie. On estime à 186 400 nouveaux cas de cancer et 75 700 décès causés par le cancer en 2012 dans une proportion de 52% chez les hommes et 48% chez les femmes. L'incidence la plus élevée de développer un cancer est au niveau de la prostate ou du sein, suivi par le cancer du poumon puis le cancer colorectal. Le cancer du poumon demeure la première cause de décès reliée à ce fléau au Canada (Société canadienne du cancer and Agence de la santé publique du Canada et Santé Canada, 2012). Ces statistiques sont inquiétantes et démontrent clairement à quel point nous devons redoubler d'effort dans la recherche pour bien comprendre la biologie de cette maladie aux multiples facettes afin de mieux la contrôler dans toute sa complexité.

La prise de conscience de ce fardeau biologique n'est réellement apparue que dans les années 1940, générant une peur grandissante dans la population. Cependant, l'histoire du cancer commence bien avant cela. En effet, des paléopathologistes ont découvert des lésions cancéreuses dans des os de dinosaures. Des observations démontrent également que les Égyptiens étaient au courant de cette maladie. Un papyrus contenant des hiéroglyphes faisant mention d'un cancer du sein humain et datant d'au moins 1 600 av. J.-C. a même été retrouvé. Des autopsies de momies réalisées vers le quatrième siècle av. J.-C. ont ensuite décrit plusieurs types de cancers comme des lésions osseuses, des cancers de l'estomac ou encore des tumeurs utérines. C'est d'ailleurs à ce moment qu'Hippocrate inventa le terme 'carcinome' et désigna alors par un nom cette calamité grandissante (Pitot, 1986, 2012).

1.1 Tumorigénèse

Depuis le temps d'Hippocrate, nos connaissances sur le sujet se sont de beaucoup étendues et nous avons maintenant une bonne idée de la façon dont se forment les tumeurs. Certaines mutations au sein d'une cellule peuvent induire des défauts lui permettant de croître

au mauvais moment ou au mauvais endroit. Une tumeur va trouver son origine dans cette cellule mutée qui aura perdu sa régulation normale et proliférera pour former une masse contenant plusieurs cellules cancéreuses. Les mutations peuvent être induites en réponse à l'exposition à des carcinogènes chimiques ou à des radiations causant des dommages aux acides désoxyribonucléiques (ADN). Des altérations génétiques peuvent également survenir lors de l'infection par certains virus à ADN comme c'est le cas pour le virus du papillome humain pouvant mener à des cancers du col de l'utérus. D'autres mutations ou anomalies chromosomiques peuvent être héréditaires et augmenter le risque de développer un cancer chez des personnes de la même famille.

1.1.1 Résistance à l'apoptose, prolifération non contrôlée

Les cellules sont dotées de mécanismes moléculaires de vérification de différents points de contrôle pouvant arrêter la prolifération et activer des enzymes pour la réparation de l'ADN lorsque des défauts sont détectés. Toutefois, lorsque les dommages sont trop importants, les cellules peuvent mettre en branle une cascade de protéines menant à l'activation de l'apoptose. Les cellules cancéreuses, quant à elles, résistent bien souvent à ce contrôle. Le gène codant pour la protéine p53 et permettant l'activation de l'apoptose est parmi les plus mutés dans tout type de cancer (Blagosklonny et al., 2012; Frank et al., 2012).

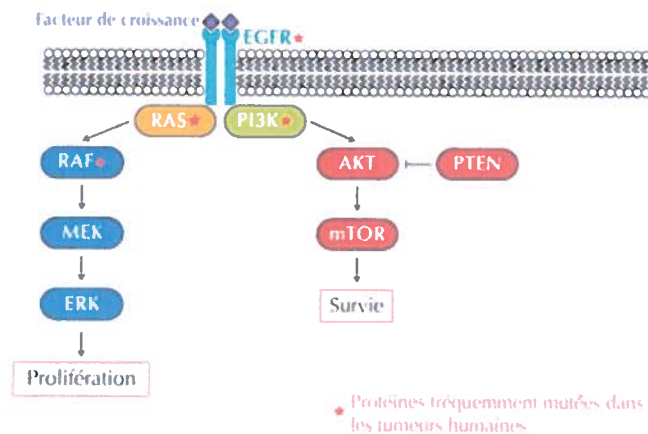


Figure 1. Altérations des voies de signalisation de la survie et de la prolifération dans les cellules cancéreuses. Lors de la liaison des facteurs de croissance sur leur récepteur, les voies Ras ou PI3K peuvent être activées. La première mènera vers des signaux de prolifération tandis que la deuxième favorisera plutôt la survie. Plusieurs protéines intermédiaires peuvent, si mutées, profiter aux cellules cancéreuses. Adapté de (Francoz et al., 2012).

Dans les cellules tumorales, à peu près chaque étape de la signalisation normale menant à la croissance et la survie cellulaire peut être mutée. Malgré tout, il existe trois grandes catégories de défaut, soit une réponse accrue aux facteurs de croissance épidermique, une réponse cellulaire débalancée ayant une activation augmentée des intermédiaires de la voie de signalisation ou une diminution des protéines de contrôle induisant alors une signalisation prolongée (Luna, 2012). Une mutation de Ras ou Raf par exemple pourra induire une activation constitutive de la voie MEK-ERK menant à une prolifération ininterrompue. Dans un même esprit, une mutation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) peut induire des signaux de survie limitant l'induction de l'apoptose dans les cellules transformées. D'un autre côté, un mal fonctionnement de la phosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) empêchera de freiner la voie PI3K/Akt augmentant ainsi la durée et l'intensité de cette signalisation (**Figure 1**).

1.1.2 Perte de sénescence

Normalement, la plupart des cellules ont l'habileté de se diviser plusieurs fois. Cependant, un contrôle de ce potentiel prolifératif est essentiel. La sénescence limite donc le nombre de divisions que les cellules peuvent réaliser. En fait, chaque division réduit la longueur des télomères aux extrémités des chromosomes (Harley et al., 1990). Des mécanismes contrôlent donc le nombre de fois où le matériel génétique peut être répliqué. Dans certaines cellules tumorales, l'enzyme télomérase peut ajouter des répétitions télomériques permettant le maintien de la longueur des télomères (Kim et al., 1994). Une mutation ou une perte de chromosomes contenant des gènes de sénescence permet également à une cellule cancéreuse de devenir immortelle et de se diviser à l'infini (Blagosklonny et al., 2012; Campisi, 2005).

1.1.3 Angiogenèse

Il a aussi été démontré que l'angiogenèse est nécessaire pour alimenter les cellules en nutriments et en oxygène permettant la croissance tumorale et essentielle au développement d'une masse cliniquement apparente (Naumov et al., 2006). Une étape majeure dans

l'établissement de l'angiogenèse est la production par les cellules cancéreuses de protéines comme le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) qui active les cellules endothéliales à migrer, proliférer, former des tubules et sécréter des protéases pour la dissolution des membranes basales environnant les cellules (Blagosklonny et al., 2012).

1.1.4 Génération de métastases

Les cellules tumorales peuvent aussi acquérir des mutations leur permettant de se dissocier de la masse primaire, de rejoindre la circulation sanguine ou lymphatique et envahir d'autres tissus afin de former des tumeurs secondaires appelées métastases. Des dizaines de milliers de cellules cancéreuses peuvent ainsi rejoindre la circulation chaque jour, mais seulement 0,01% de celles-ci pourront survivre et générer des lésions métastatiques (Chambers et al., 2002; Fidler, 1970). La biologie des métastases est toutefois complexe et encore mal comprise. Les chercheurs et cliniciens s'entendent cependant pour dire qu'il doit s'agir d'un processus faisant intervenir plusieurs étapes dont l'acquisition de propriétés de migration, de motilité, d'échappement vers la circulation, d'implantation dans un nouveau milieu et de prolifération. L'apparition de métastases est signe de mauvais pronostic puisqu'elle est responsable de plus de 80% des décès dus au cancer (Blagosklonny et al., 2012).

1.2 Microenvironnement tumoral

L'approfondissement de nos connaissances du microenvironnement tumoral nous a démontré qu'une variété de cellules stromales est recrutée par les tumeurs (Tlsty and Coussens, 2006). L'homéostasie normale d'un tissu fait généralement intervenir la matrice extracellulaire facilitant ainsi les interactions entre les divers types cellulaires et en leur fournissant des signaux de survie et de différenciation. Des études ont démontré un rôle important des fibroblastes du stroma dans le contrôle de la progression maligne de cellules épithéliales transformées (Hayashi and Cunha, 1991; Olumi et al., 1999). Cet environnement peut cependant être débalancé et influencer le comportement d'une cellule cancéreuse.

Pendant le développement précoce d'une tumeur, les contraintes protectives du microenvironnement sont substituées par des conditions d'inflammation chronique menant vers un état favorisant la croissance des cellules tumorales.

Plusieurs types cellulaires sont impliqués dans la promotion de la croissance tumorale comme c'est le cas des cellules endothéliales, les péricytes, les fibroblastes et plusieurs cellules dérivées de la moelle osseuse tels les macrophages, neutrophiles, mastocytes, cellules myéloïdes suppressives (MDSC) et cellules souches mésenchymateuses (MSC) (Tableau 1). Il n'y a cependant pas encore d'association claire entre la présence d'un certain type de cellules de l'immunité innée ou adaptative et un résultat défini en termes d'agressivité ou de pronostic d'un cancer particulier. Certaines cellules peuvent même avoir des rôles totalement opposés compte tenu du contexte tissulaire et des stimuli cellulaires (de Visser et al., 2006; Ostrand-Rosenberg, 2008b).

Tableau 1. Fonctions des différentes cellules retrouvées dans le microenvironnement tumoral. Adapté de (Joyce and Pollard, 2009).

<i>Type cellulaire</i>	<i>Fonction dans le microenvironnement tumoral</i>
Macrophages associés aux tumeurs (TAM)	Macrophages activés M1 contribuent au rejet tumoral via la production de cytokines de type 1 et la présentation d'antigènes; les macrophages M2 promeuvent l'angiogenèse et le remodelage via la production de cytokines de type 2. Les TAM auraient tendance à démontrer plus souvent un phénotype M2.
Cellules suppressives myéloïdes (MDSC)	Présentes dans presque tous les patients et modèles animaux de cancer. Supprime la fonction des lymphocytes T.
Cellules souches mésenchymateuses (MSC)	Infiltrant une grande variété de cancers humains et sont associées à la dissémination des cellules cancéreuses dans les modèles animaux. Elles sont également immunosuppressives en partie due à l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T.
Neutrophiles	Impliqués dans l'augmentation de l'angiogenèse et des métastases dans certains modèles animaux.
Mastocytes	Importants dans la génération et le maintien des réponses immunitaires innées et adaptatives. Peuvent être impliquées dans la modification des cellules tumorales vers un phénotype angiogénique.
Cellules endothéliales	Font partie de la vasculature sanguine de la tumeur et augmentent la densité des microvaisseaux.
Cellules endothéliales progénitrices (EPC)	Contribuent à la formation des vaisseaux sanguins.
Péricytes	Cellules localisées au niveau de la lame basale de l'endothélium des capillaires qui apportent le support et la stabilisation, de même que des facteurs de survie, aux vaisseaux sanguins. Elles pourraient être cruciales dans la limitation des métastases en maintenant l'intégrité des vaisseaux.
Fibroblastes	Composante du stroma tumoral.
Plaquettes	Activées et circulant à des taux élevés chez les patients atteints de cancer.
Lymphocytes T CD4 ⁺	T _H 1 aident des lymphocytes T CD8 ⁺ dans le rejet de la tumeur tandis que les T _H 2 polarisent l'immunité vers une réponse favorisant la tumeur en augmentant les cellules T régulatrices bloquant les T CD8 ⁺ .
Lymphocytes T CD8 ⁺	Cellules effectrices de l'immunité adaptative pouvant reconnaître spécifiquement les cellules tumorales et les détruire via la dégranulation de perforine et granzymes.
Lymphocytes B	Médiateurs de l'immunité humorale pouvant promouvoir certains types de tumeur.
Cellules NK	Cellules effectrices de l'immunité innée pouvant lyser les cellules tumorales. Elles contribuent également à l'immunosurveillance.

1.2.1 Fibroblastes associés aux tumeurs

La contribution des fibroblastes associés au cancer dans la progression de différentes tumeurs est de plus en plus étudiée. Par exemple, dans des modèles de cancers de la prostate (Franco and Hayward, 2012), de cancers pancréatiques (Hwang et al., 2008), de cancer du cou et de la tête (Johansson et al., 2012), de même que des cancers du sein (Kojima et al., 2010), ces fibroblastes peuvent augmenter la prolifération des cellules tumorales, leur invasion et leur résistance aux chimiothérapies. De plus, certaines études démontrent que les fibroblastes associés au cancer jouent un rôle majeur dans la modulation de l'angiogenèse, l'infiltration de certaines cellules immunitaires de même que la colonisation métastatique (O'Connell et al., 2011; Raz and Erez, 2013; Vong and Kalluri, 2011). Dans une étude récente, les fibroblastes associés à des carcinomes du colon ont démontré un taux élevé d'expression de la molécule d'adhésion ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) et une affinité accrue pour les cellules monocytiques (Schellerer et al., 2013). Finalement, une équipe a également démontré le potentiel de ces fibroblastes dans l'initiation et la progression de cancers ovariens et la possibilité de corrélérer l'agressivité de la maladie à l'expression de la protéine d'activation des fibroblastes (FAP) (Mhaweck-Fauceglia et al., 2013).

1.2.2 Macrophages associés aux tumeurs

Les macrophages peuvent modifier le comportement des cellules tumorales et sont à même de promouvoir l'angiogenèse, l'invasion, l'intravasation et la métastase dans divers modèles animaux (Condeelis and Pollard, 2006; Pollard, 2004). Cependant, il existe peu d'information concernant la complexité des fonctions de ces cellules individuellement et leur profil moléculaire associé au cancer. En effet, les facteurs contrôlant la balance entre la promotion et la suppression des tumeurs par les macrophages et comment cet équilibre peut être perturbé tout au long de la progression du cancer sont toujours inconnus. Il a été proposé que diverses sous-populations de macrophages associés aux tumeurs (TAMs) puissent exister au sein de la tumeur; des TAMs recrutés dans les régions hypoxiques pourraient contribuer à l'angiogenèse tandis que ceux à l'interface tumeur-stroma faciliteraient l'invasion des cellules (Lewis and Pollard, 2006; Ojalvo et al., 2009). Il a été démontré qu'un des

mécanismes impliqués dans l'invasion induite par les TAMs implique une boucle paracrine où le facteur de croissance épidermique (EGF) produit par les macrophages augmente l'invasion et la migration de cellules tumorales exprimant son récepteur (EGFR) telles les cellules de cancer du sein. Ces dernières peuvent en retour exprimer le facteur de stimulation de colonies 1 (CSF1) jouant un rôle chimioattractant pour les TAMs qui expriment son récepteur CSF1R (Goswami et al., 2005; Wyckoff et al., 2004). Il a aussi été démontré que certains macrophages pouvaient jouer un rôle dans l'établissement d'un réseau vasculaire. Ces cellules peuvent effectivement relarguer des facteurs angiogéniques tel le VEGF et participer à la fusion des vaisseaux sanguins (Fantin et al., 2010). D'autres études ont également attesté que les tumeurs, tout comme les tissus en développement ou en régénération, pouvaient activement recruter ces macrophages de la circulation (Pucci et al., 2009).

1.2.3 Cellules myéloïdes suppressives

Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) partagent un progéniteur commun avec les TAMs (Gabrilovich et al., 2007). Ces cellules sont capables de supprimer la réponse immunitaire adaptative principalement en bloquant les fonctions des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, soit par la production d'arginase et d'oxyde nitrique, par la stimulation de l'expansion de cellules T régulatrices ou par l'inhibition de l'activation des cellules NK (Marigo et al., 2008; Sica and Bronte, 2007). Les MDSC comprennent différentes cellules myéloïdes à divers stades de différenciation. Il a été démontré que le nombre de ces dernières est élevé dans la moelle osseuse, le sang et la rate autant des patients cancéreux que dans les modèles animaux et leur accumulation est associée à la croissance tumorale (Ostrand-Rosenberg, 2008b). Une perturbation de la signalisation du facteur de croissance transformant- β (TGF- β) par les cellules tumorales pourrait être reliée à l'augmentation du guidage des MDSC aux tumeurs (Yang et al., 2008).

1.2.4 Cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) résident préférentiellement dans la moelle osseuse bien qu'elles ne soient pas d'origine hématopoïétique. Ce sont des cellules multipotentes pouvant se différencier en ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes ou toutes autres cellules d'origine mésenchymateuse (Pittenger et al., 1999). Les MSCs sont recrutées en grande quantité au site tumoral et ces cellules sont même désormais à l'étude comme véhicule de transport d'agents anticancéreux de toute sorte vers la tumeur (Dembinski et al., 2010; Mader et al., 2013; Spaeth et al., 2008). Ces cellules pourraient toutefois modifier le comportement des cellules composant la tumeur et augmenter leur potentiel métastatique (Karnoub et al., 2007). Il faudra donc faire preuve de prudence et bien comprendre comment les MSCs peuvent communiquer avec les cellules tumorales et changer leur phénotype afin de les utiliser adéquatement à des fins thérapeutiques.

1.2.5 Cellules souches cancéreuses

Un concept assez récent pour expliquer l'origine des tumeurs propose qu'elles puissent être générées continuellement par une petite sous-population cellulaire appelée cellules souches cancéreuses (CSC). Ces dernières seraient responsables de la croissance de masses malignes, de la génération de métastases et de la récurrence des cancers. Les CSC sont caractérisées par leur autorenouvellement et leur capacité à créer une population hétérogène créant ainsi la masse tumorale. Ces cellules sont également résistantes aux traitements antitumoraux conventionnels et seraient responsables en grande partie de la rechute des patients après traitements (Blagosklonny et al., 2012).

2. Rôles du système immunitaire

L'idée que le système immunitaire puisse avoir un effet protecteur dans le contrôle tumoral nous vient de Paul Ehrlich au début des années 1900. Cependant, la compréhension de la composition et des fonctions du système immunitaire était trop limitée pour valider ce concept. Il aura fallu plus de cinq décennies avant d'arriver à une théorie de surveillance mieux définie.

2.1 Immunosurveillance

L'hypothèse d'immunosurveillance du cancer décrite par Burnet et Thomas stipule que l'immunité adaptative est responsable de la prévention du développement de cancer dans des hôtes immunocompétents (Burnet, 1957; Thomas, 1959). Toutefois, plusieurs études ont démenti cette hypothèse en démontrant que la susceptibilité de souris immunocompétentes à développer des cancers spontanés ou induits par des carcinogènes était la même que pour des souris immunodéficientes (Stutman, 1974, 1976). Des études subséquentes ont démontré que certaines tumeurs ne possèdent pas de signaux de dangers pouvant alerter le système immunitaire (Matzinger, 1994), que ce dernier est ignorant ou tolérant face aux cellules cancéreuses trop similaires aux cellules normales (Pardoll, 2003) et que dans certains cas, une activation persistante du système immunitaire inné peut contribuer à la transformation cellulaire et promouvoir le cancer (Balkwill and Mantovani, 2001; Karin et al., 2002). Cependant, avec l'arrivée de bons modèles de souris transgéniques pour étudier le système immunitaire, il a été clairement démontré que l'immunité peut fonctionner comme un élément extrinsèque suppresseur de tumeur (Kaplan et al., 1998; Shankaran et al., 2001; Smyth et al., 2000). On peut donc maintenant répertorier au moins trois rôles principaux dans la prévention du cancer soit la protection contre les infections virales pouvant induire des tumeurs, la prévention de l'établissement d'un environnement inflammatoire chronique facilitant la tumorigénèse et l'élimination de certaines cellules tumorales exprimant des ligands aux récepteurs d'activation de cellules immunitaires (Schreiber et al., 2011). La théorie de l'immunosurveillance sous-tend en effet que les cellules tumorales doivent

exprimer des antigènes les différenciant des cellules non transformées. Ces antigènes sont bien souvent le produit de gènes cellulaires mutés, de l'expression aberrante de gènes normaux ou encore de gènes codant pour des protéines virales.

2.2 Immunoédition

Ce n'est qu'en 2001 que le concept de l'immunosurveillance fut totalement révisé lors de la découverte stipulant que le système immunitaire contrôle autant la croissance des cellules tumorales que leur immunogénicité (Dunn et al., 2002; Shankaran et al., 2001). Il fut alors démontré que les tumeurs formées chez des souris immunodéficientes étaient plus immunogéniques que des tumeurs similaires provenant de souris immunocompétentes. Ceci mena donc à l'élaboration de la théorie de l'immunoédition. Cette dernière postule que les tumeurs passent par trois étapes séquentielles soit l'élimination, l'équilibre et l'évasion (Figure 2).

2.2.1 Élimination

Cette phase correspond en fait à la théorie de l'immunosurveillance améliorée. C'est dans cette période que le système immunitaire inné et adaptatif détecte les cellules tumorales et les détruit avant que la tumeur ne devienne cliniquement apparente (Schreiber et al., 2011). Parmi les mécanismes connus de reconnaissance de ces cellules par le système immunitaire, l'interféron de type I (IFN) induit tôt lors du développement tumoral pourrait servir de signal de danger (Matzinger, 1994). D'autres molécules ont aussi été identifiées comme potentiellement inductrices de la reconnaissance immune tels les patrons moléculaires associés au danger (DAMPs) relargués par les cellules tumorales mourantes ou les tissus endommagés avoisinants (Sims et al., 2010). Certains ligands de stress fréquemment exprimés par les cellules transformées peuvent également se lier directement aux récepteurs de cellules immunitaires et induire leur activation tout en favorisant la production de cytokines pro-inflammatoires et immunomodulatoires menant à une réponse antitumorale spécifique (Guerra et al., 2008). De façon générale, il semble que les composantes de l'immunité requises pour l'élimination des tumeurs soient dépendantes des caractéristiques

propres de ladite tumeur comme son origine, son emplacement et/ou sa rapidité de croissance (Schreiber et al., 2011).

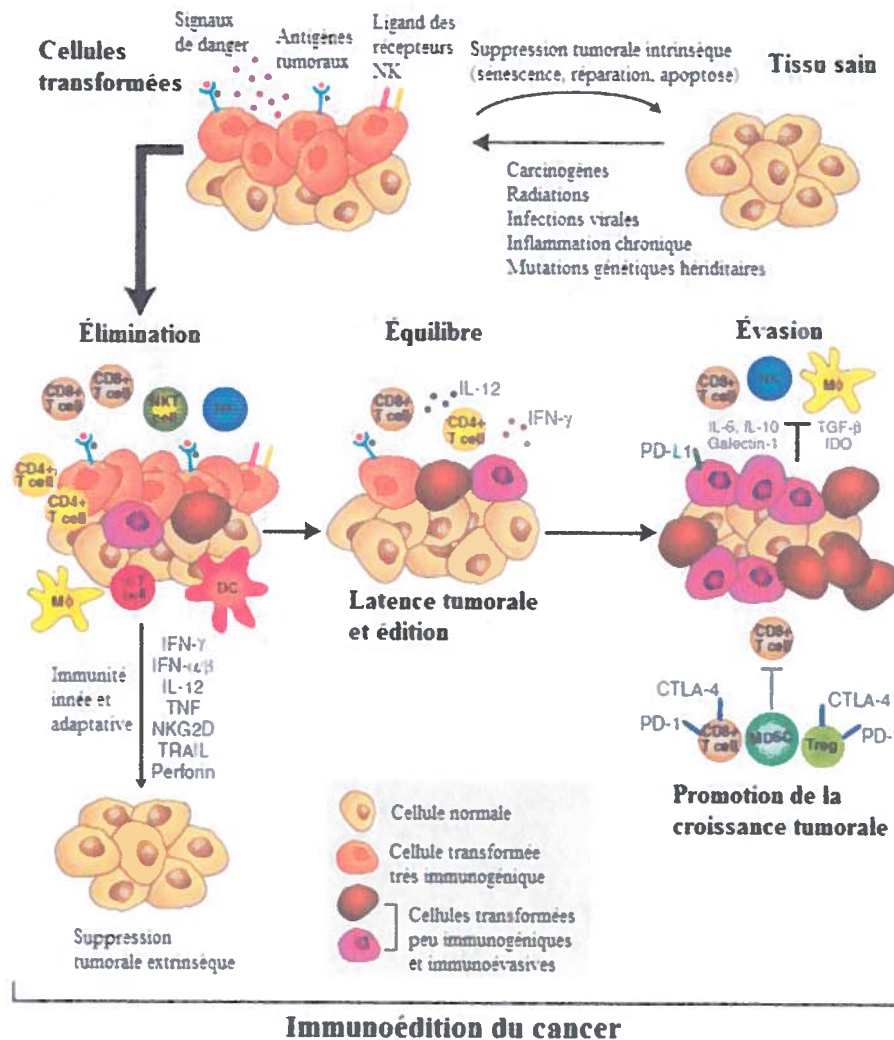


Figure 2. Concept de l'immunoédition du cancer. L'immunoédition du cancer passe par trois phases majeures soit la phase d'élimination, d'équilibre puis d'évasion. Ces dernières sont modulées en fonctions des cellules immunitaires infiltrantes, des cytokines sécrétées et de l'accumulation de mutations au sein des cellules tumorales. Adapté de (Schreiber et al., 2011).

Parmi les cellules de l'immunité innée très impliquées dans l'élimination des cellules tumorales émergentes se retrouvent les cellules *Natural Killer* (NK). Ces dernières ont un potentiel antitumoral de par leur habileté à détruire les cellules exprimant de faibles taux de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I, fait courant chez plusieurs types de cancer. De plus, les cellules NK produisent des cytokines pro-inflammatoires pouvant activer d'autres cellules de l'immunité innée et adaptative (Cerwenka and Lanier, 2001).

2.2.2 Équilibre

Lorsque des variants cellulaires survivent à la phase d'élimination, ils peuvent entrer dans la phase d'équilibre où le système immunitaire adaptatif limite l'excroissance tumorale tout en modelant l'immunogénicité des cellules cancéreuses. Cette phase est considérée comme la plus longue et pourrait même perdurer tout au long de notre existence. Le système immunitaire maintient ainsi les cellules transformées résiduelles dans un état que l'on qualifie de dormance fonctionnelle (Aguirre-Ghiso, 2007). Il a été démontré que seule l'immunité adaptative était responsable de cet équilibre (Eyles et al., 2010; Loeser et al., 2007). En effet, des études ont permis de corrélérer la quantité, la qualité et la distribution spatiales de lymphocytes infiltrant la tumeur avec la survie de patients atteints de divers cancer (Galon et al., 2006). L'infiltration des masses cancéreuses avec des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ pouvant sécréter de l'IFN- γ et du TNF- α est d'ailleurs généralement signe de pronostic favorable (Galon et al., 2006; Pagès et al., 2005; Sato et al., 2005; van Houdt et al., 2008). Cependant, les mêmes fonctions immunitaires permettant le contrôle de la croissance tumorale induisent également une pression de sélection qui promeut la sélection des cellules ayant acquis des mutations rendant ces dernières plus immunoévasives.

2.2.3 Évasion

La phase d'évasion survient lorsque des cellules tumorales ont acquis l'habileté de contrecarrer leur reconnaissance ou élimination par le système immunitaire et peuvent donc croître afin de devenir des tumeurs visibles (Tableau 2). Cela peut venir d'un changement

dans la population de cellules tumorales en réponse aux fonctions éditrices du système immunitaire ou de changements dans le système immunitaire de l'hôte en réponse à une immunosuppression induite par le cancer (Schreiber et al., 2011). Un des mécanismes d'évasion bien connus est la perte d'expression d'antigènes tumoraux. Que ce soit dû à une mauvaise expression d'antigènes fortement reconnus, une perte d'expression du CMH ou une déficience dans l'apprêtement ou le chargement de peptides antigéniques sur les molécules de CMH, tous ces mécanismes mènent à une faible immunogénicité des cellules cancéreuses et une faible reconnaissance de celles-ci auprès du système immunitaire (Dunn et al., 2002; Khong and Restifo, 2002).

Comme mentionnée précédemment, l'évasion des cellules tumorales peut également être le résultat de l'établissement d'un état immunosuppresseur au sein de l'environnement tumoral dû à la présence de cytokines immunosuppressives comme le VEGF ou encore le TGF- β , mais aussi la galactine ou l'indolamine 2,3-dioxygénase (IDO) (Radoja et al., 2000; Vesely et al., 2011). Le recrutement de lymphocytes T régulateurs (Treg) ou encore de cellules myéloïdes suppressives au sein de la tumeur contribue aussi à l'inhibition d'une réponse immunitaire spécifique. Les Treg sont d'ailleurs reconnus pour sécréter de l'IL-10 et du TGF- β , en plus d'exprimer des molécules de co-stimulation inhibitrices comme CTLA-4, PD-1 et PD-L1 (Schreiber et al., 2011).

Tableau 2. Mécanismes d'immunoévasion des tumeurs. Adapté de (Laheru and HJaffee, 2007).

<i>Altération de la réponse immune</i>	<i>Facteurs locaux</i>	<i>Facteurs systémiques</i>
Altérations génétiques de molécules de reconnaissance	CMH de classe-1 TAP β -2-microglobuline	-
Surexpression d'inhibiteurs	IL-10 TGF- β VEGF B7-H1 / B7-H4	IL-1 IL-6 IL-10 TGF- β
Points de contrôles immunitaires influencés par la tumeur	Perturbation de la signalisation de B7-H1 (PD-L1)	Signalisation B7.1 (CD80) / B7.2 (CD86) et CTLA-4, B7-DC (PD-L2) / PD-1, B7-H1 (PD-L1) / PD-1 par les cellules dendritiques
Défauts de localisation des cellules immunitaires	Délétion des lymphocytes T via l'accumulation de cellules T régulatrices Altération de la signalisation des chimiokines	Délétion périphérique des lymphocytes T activés via les cellules T régulatrices
Perte de co-stimulation	-	Dérégulation des molécules de la famille B7 et CD40
Effets cellulaires	Augmentation de l'apoptose des lymphocytes T Production de VEGF	Inhibition de la maturation des cellules dendritiques par la production de VEGF

Abréviations : CMH, complexe majeur d'histocompatibilité; CTLA-4, *cytotoxic T lymphocytes antigen-4*; IL, interleukine; PD-1, *programmed cell death-1*; PD-L1, *Programmed cell death ligand 1*; TAP, *transporter associated with antigen processing*; TGF- β , *transforming growth factor- β* ; VEGF, *vascular endothelial growth factor*.

Deux récentes études cliniques ont révélé le potentiel thérapeutique du blocage de CTLA-4 et PD-1 (Hamid et al., 2013; Wolchok et al., 2013). Lorsqu'administrés de façon concomitante, ils ont pu voir une régression d'au moins 80% des mélanomes résistants aux traitements conventionnels chez plus de la moitié des patients. Ces molécules servent en fait de régulateurs négatifs en interférant avec l'activation des cellules immunitaires suite à leur liaison (Keir et al., 2008). Ce type de thérapie est donc considérée bloquer les points de contrôles immunitaires empêchant l'activation de lymphocytes T spécifiques aux antigènes tumoraux leur permettant alors de fonctionner pleinement dans le microenvironnement suppressif de la tumeur (Pardoll, 2012). Malgré que les mécanismes reliant l'action des anticorps bloquants CTLA-4 ou PD-1 avec la régression tumorale ne soient pas totalement

élucidés, deux hypothèses sont principalement avancées. La première soutient que puisque les lymphocytes T spécifiques aux tumeurs expriment les deux molécules et que les cellules présentatrices d'antigènes expriment leurs ligands, les cascades de signalisation devraient utiliser des mécanismes non redondants pour bloquer l'activation des cellules T et donc agir en synergie (Parry et al., 2005a). Une autre possibilité serait que CTLA-4 et PD-1 agissent sur des cibles cellulaires différentes. En effet, l'activation chronique des lymphocytes T peut mener à l'épuisement des cellules, caractérisée par une expression élevée de PD-1. Le blocage de PD-1 peut alors rétablir les fonctions des cellules T épuisées (Wherry, 2011). De l'autre côté, les anticorps contre CTLA-4 peuvent cibler préférentiellement les Treg exprimant fortement cette molécule afin de réduire leur activité immunosuppressive (Selby et al., 2013).

Un autre mécanisme d'évasion, lorsque survient la métastase, implique la formation d'agrégats de plaquettes pouvant également augmenter la survie des cellules cancéreuses en circulation en les protégeant de la lyse induite par les cellules NK de même que par un mécanisme de signalisation indépendante couplée à la prothrombine circulante (Nieswandt et al., 1999; Palumbo et al., 2007). Une autre hypothèse, quoique controversée, serait que des cellules cancéreuses pourraient fusionner avec des macrophages et ainsi acquérir des traits de cellules myéloïdes pouvant être bénéfiques pour leur survie dans la circulation et le guidage vers d'autres organes (Pawelek and Chakraborty, 2008).

2.3 Réponse aux infections virales aiguës

Le système immunitaire ne sert bien évidemment pas seulement à l'immunoédition. Il est en effet constamment sollicité pour faire face à une multitude d'agresseurs notamment les infections virales. Les virus sont des pathogènes intracellulaires obligatoires dépendants de l'hôte pour leur réplication et leur propagation. L'organisme a toutefois évolué afin de développer différents mécanismes de protection contre ces assaillants. Ces mécanismes agissent tant au niveau cellulaire que systémique.

2.3.1 Mécanismes de défense cellulaires

Lorsqu'un virus infecte des cellules cibles, divers mécanismes de protection se mettent en branle. Un gène très intimement relié à la résistance aux virus a été découvert à la fin des années 80, soit le gène *Mx1* localisé sur le chromosome murin 16 (Reeves et al., 1988) ayant une activité antivirale intrinsèque (Arnheiter et al., 1990; Staeheli et al., 1986). Ce gène s'est par la suite avéré être un gène de réponse à l'interféron (IFN) étant strictement régulé par l'interféron de type I (α et β) et III (λ) (Holzinger et al., 2007). L'interféron de type I est produit par les cellules en réponse directe à l'infection virale et comprend plusieurs sous-espèces d'IFN- α et une seule espèce d'IFN- β (van Pesch et al., 2004). Certaines molécules conservées sur les virions agissent comme signaux de danger et sont reconnues par des récepteurs particuliers à la surface cellulaire. Ces derniers sont appelés récepteurs de patrons de reconnaissance (PRRs) et reconnaissent des patrons moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs). Les PAMPs peuvent être sous forme d'acides nucléiques, comme les intermédiaires de réplication d'ARN double brins (Weber et al., 2006) ou encore certaines structures en 5' des ARN simple brin viraux (Hornung et al., 2006; Pichlmair et al., 2006). Par la suite, le facteur de régulation de l'interféron 3 (IRF-3) jouera un rôle central dans la régulation de la transcription des interférons (Hiscott, 2007). Différents récepteurs de type Toll pourront être mis à contribution dans la reconnaissance des virus. Le TLR3 reconnaît l'ARN double brin (des génomes viraux double brin ou des intermédiaires de réplication) tandis que les TLR7/8 reconnaissent l'ARN simple brin. Le TLR9 quant à lui reconnaît l'ADN viral contenant des motifs CpG non méthylés (Boehme and Compton, 2004). D'autres TLR peuvent aussi être impliqués tels que le TLR2 et le TLR4 qui peuvent reconnaître certains composants viraux comme des glycoprotéines d'enveloppe (Barton, 2007; Gaudreault et al., 2007; Kurt-Jones et al., 2000). La reconnaissance des ARN doubles brins peut aussi se faire par l'hélicase ARN du gène inducible par l'acide rétinoïque 1 (RIG-I) et/ou de la protéine associée à la différenciation du mélanome 5 (MDA5). La détection des virus activera les kinases IKK ϵ et TBK-1 pouvant phosphoryler IRF-3 (Andrejeva et al., 2004; Baccala et al., 2007; Fitzgerald et al., 2003; Sharma et al., 2003; Uematsu and Akira, 2007; Yoneyama et al., 2004). Ce dernier sera alors en mesure de transloquer au noyau et de recruter des coactivateurs comme la protéine de liaison à la CREB (CBP) afin d'initier la

transcription de l'ARN messager de l'interféron- β (Hiscott, 2007). Alternativement, la voie de signalisation NF- κ B peut aussi mener à l'expression d'IFN. Finalement, le facteur IRF-7 pourra agir comme boucle de rétroaction positive en coopérant avec IRF-3 afin d'amplifier la synthèse d'IFN (Levy et al., 2003; tenOever et al., 2004).

Toutes les sous-espèces d'IFN- α de même que l'IFN- β se lient à un récepteur commun (IFNAR). Ce dernier signale au noyau via la voie de signalisation Janus kinase - Signal transducteur et activateur de la transcription (JAK-STAT). Plus de 300 gènes stimulés par l'interféron (ISG) peuvent être activés par les interférons de type I et III combinés et induire des effets antiviraux, antiprolifératifs et immunomodulateurs (de Veer et al., 2001; Der et al., 1998). Au niveau de la réponse antivirale, la protéine kinase R (PKR) et la GTPase Mx sont les plus étudiées (García et al., 2006; Haller and Kochs, 2002; Williams, 1999). Les organismes ou cellules déficients dans un ou l'autre de ces facteurs seront en effet hautement susceptibles aux infections virales (Zhou et al., 1997; Zhou et al., 1999).

Les cellules infectées peuvent ensuite être reconnues par le système immunitaire. En effet, la présentation antigénique restreinte aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) joue un rôle important dans l'initiation d'une réponse immunitaire contre les cellules infectées. Les molécules du CMH-I, exprimées à la surface de toutes les cellules nucléées, présentent des fragments peptidiques dérivés de protéines intracellulaires. Normalement, la plupart des peptides présentés par les molécules de CMH-I sont dérivés de produits de traduction ribosomale défectueuse dégradés par le protéasome (Princiotta et al., 2003; Reits et al., 2000; Schubert et al., 2000). Dans un contexte d'infection, des peptides viraux peuvent aussi être présentés. C'est alors que des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques au virus pourront repérer les cellules infectées et les détruire. Toutefois, plusieurs virus ont évolué de manière à interférer avec le bon fonctionnement de la signalisation par le CMH-I.

Certains antigènes associés aux tumeurs et exprimés de façon exogène par les cellules cancéreuses via le CMH-I peuvent aussi être reconnus par des lymphocytes T cytotoxiques. Cependant, les interactions entre les tumeurs et les lymphocytes T ne sont généralement pas

suffisantes pour activer des cellules naïves comme dans les cas d'infections virales. Les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, comme les cellules dendritiques (DCs), peuvent quant à elles internaliser et présenter des antigènes exogènes (Lanzavecchia, 1998). Ce phénomène de présentation croisée peut également être possible lorsque des cellules tumorales infectées par des virus sont lysées et des fragments peptidiques tumoraux sont relargués dans un environnement propice à leur internalisation par les DCs (Jung et al., 2002; Morón et al., 2004; Sigal et al., 1999).

2.3.2 Mécanismes de défense systémiques

Dès qu'un virus entre dans l'organisme, il est généralement immédiatement reconnu comme un pathogène étranger et une réponse antivirale à base d'anticorps est générée (Buchmeier and Oldstone, 1978; Maruyama et al., 1999). Ces anticorps pourront neutraliser les particules virales en fonction de leur affinité et/ou avidité pour certaines structures exposées à la surface des virions (Bachmann et al., 1997; Roost et al., 1995). Les anticorps neutralisants fonctionnent majoritairement en interférant avec la liaison du virus sur les récepteurs des cellules cibles. De façon générale, l'anticorps se liera à la surface du virion et empêchera la reconnaissance du récepteur par obstruction stérique (Fleury et al., 1999; Roben et al., 1994). Cependant, il a aussi été démontré que les anticorps neutralisants pouvaient induire un changement conformationnel des protéines de surfaces (Emini et al., 1983) ou interférer avec ces changements souvent requis pour la fusion du virus à la cellule (Chan and Kim, 1998; Outlaw and Dimmock, 1993). Certains virus cytopathiques, tels que le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), possèdent une enveloppe très dense constituée d'une multitude de copies d'une seule glycoprotéine. Ceci implique donc qu'une toute petite partie de cette protéine est accessible pour lier le récepteur cellulaire ou pour la liaison des anticorps. De plus, ces particules virales ne présentent qu'un seul site antigénique et les anticorps pouvant lier cette région seront typiquement neutralisants (Lefrancois and Lyles, 1982; Roost et al., 1995). Les premiers anticorps neutralisants générés sont indépendants de l'aide apporté par les lymphocytes T et sont constitués majoritairement d'immunoglobuline M (IgM) (Burns et al., 1975; Szomolanyi-Tsuda and Welsh, 1998). Ensuite, une commutation isotypique vers, entre autres, des IgG de plus longue demi-vie pourra être réalisée afin de maintenir des titres sériques en anticorps avec moins de cellules productrices (Vieira and Rajewsky, 1988). Cette

commutation dépendante des lymphocytes T a été rapportée comme essentielle pour la survie des souris lors de certaines infections virales (comme par le VSV), probablement dû au potentiel de diffusion des IgG dans les tissus enflammés (Andersen et al., 1999; Thomsen et al., 1997). Cependant, malgré que des virus très cytopathiques soient généralement bien contrôlés par une réponse en anticorps, d'importantes doses de virus peuvent également induire l'activation d'une réponse en lymphocytes T cytotoxiques (Seiler et al., 1998).

Les particules virales peuvent également être reconnues par des anticorps polyréactifs de faible affinité présents en petite quantité dans le sang appelés anticorps naturels. Ces derniers peuvent se lier à différentes protéines, nucléotides, polysaccharides ou lipides (Ditzel et al., 1996). Cette classe d'anticorps lie l'immunité innée et adaptative en restreignant la dissémination virale (Ochsenbein and Zinkernagel, 2000) en plus de contribuer au recrutement des antigènes viraux aux organes lymphoïdes secondaires (Ochsenbein et al., 2000). Le système du complément, reconnaissant les complexes immuns formés d'anticorps et de particules virales, contribuera lui aussi à ce recrutement d'antigènes (Kopf et al., 2002; Ochsenbein and Zinkernagel, 2000).

2.4 Le système du complément

Le système du complément, comprenant plus de trente protéines membranaires et solubles principalement synthétisées au foie, est très complexe autant dans sa régulation que dans ses applications (Walport, 2001b). Il peut être activé selon 3 voies principales nommées voie classique, voie des lectines et voie alterne (**Figure 3**). La voie classique est initiée suite à la liaison de la molécule soluble C1q à une immunoglobuline de type G (IgG) ou M (IgM) lié à un antigène formant ainsi des complexes immuns (Kishore and Reid, 2000). La voie des lectines, quant à elle, est initiée en réponse à la reconnaissance par la lectine liant le mannose (mannose-binding lectin; MBL) ou par une ficoline liant un motif contenant des résidues N-acétyl ou carbohydrate (Thiel, 2007). Finalement, la voie alterne implique l'auto-activation de la molécule C3 sur la surface de micro-organismes ou par certaines protéases comme la thrombine (Kemper et al., 2010). Les trois voies d'activation du complément vont converger

vers le clivage de la molécule C3 et former l'anaphylatoxine C3a et l'opsonine C3b (Walport, 2001b). C3b sera ensuite rapidement clivé en divers régulateurs tels iC3b, C3c ou C3dg (Liszewski et al., 2008). La C3 convertase pourra également générer de grandes quantités de C3b via une boucle d'amplification de la voie alterne. C3b pourra alors se lier directement à la surface de certaines cellules ou micro-organismes avoisinants ou se lier à la C3 convertase et ainsi générer la C5 convertase. Cette dernière sera responsable du clivage de C5 en C5a, une autre anaphylatoxine, et C5b (Walport, 2001a, b). Finalement, le fragment C5b s'associera avec C6 et C7 qui pourra s'insérer dans les membranes cellulaires, lier C8 et C9, puis compléter la formation d'un complexe d'attaque membranaire (membrane attack complex; MAC) (Bubeck et al., 2011). Lorsque formés en quantité suffisante, les MAC induiront la lyse des cellules cibles (Walport, 2001a).

L'activation de la cascade du complément est extrêmement bien régulée. En effet, plusieurs inhibiteurs peuvent jouer sur différentes protéines du complément et ainsi limiter leur action. C'est entre autres le cas de la protéine membranaire CD46 qui peut médier l'inactivation du C3b et ainsi empêcher son intégration pour former la C3 convertase (Liszewski et al., 2008; Liszewski et al., 1991). On connaît également le facteur accélérateur de la dissociation (decay-accelerating factor; DAF), aussi appelé CD55, une glycoprotéine liée de façon covalente à une protéine membranaire glycophospholipidique, qui reconnaît les fragments C4b et C3b et interfère avec leur activité catalytique afin de prévenir l'assemblage de la C3 convertase (Ward et al., 1994). Puis, il existe l'inhibiteur membranaire de lyse réactive, CD59, qui protège les cellules du soi d'une lyse non spécifique en se liant au C8 et/ou C9, empêchant donc la formation du MAC (Davies et al., 1989; Ninomiya and Sims, 1992).

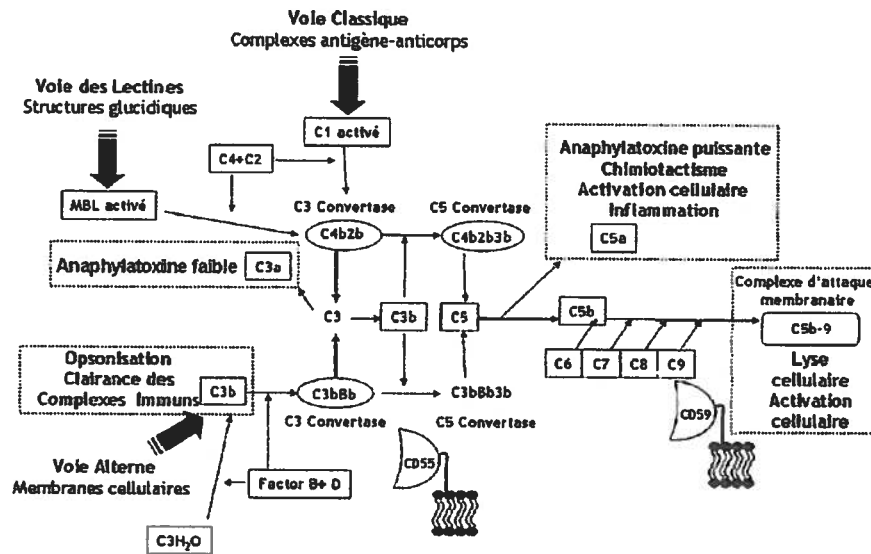


Figure 3. Cascade d'activation du complément. La cascade du complément peut être activée selon trois voies soit la voie classique, des lectines ou encore alterne. Plusieurs facteurs requis diffèrent dans chacune des voies, mais toutes convergent vers l'activation de la molécule C3. Tiré de (Peffault de Latour et al., 2010).

Historiquement, le système du complément était considéré simplement comme un joueur complémentaire de l'immunité innée pouvant médier l'élimination de certains pathogènes, cibler les cellules apoptotiques et induire l'inflammation (Ricklin and Lambris, 2007). En fait, les fonctions de base du complément comprennent la lyse des cellules, bactéries et virus, l'opsonisation d'antigènes circulants, la liaison directe à des récepteurs spécifiques du complément sur certaines cellules immunitaires de même que l'élimination des complexes immuns par leur transport à la rate et au foie (Carroll, 1998; Frank and Fries, 1991; Kinoshita, 1991).

2.4.1 Rôles du complément dans le contrôle des infections virales

Il est maintenant bien connu que le complément soit sollicité lors d'infections bactériennes ou virales. L'opsonisation des complexes immuns et des antigènes particuliers par le C3b, mais aussi par le C4b et le iC3b, permet aux cellules phagocytaires exprimant des récepteurs au complément de les reconnaître et d'engager la phagocytose. Cependant, le système du complément peut également jouer un rôle plus spécifique dans la défense contre les virus en participant à leur neutralisation. Un dépôt de protéines du complément sur la

surface des virions peut médier leur phagocytose, mais aussi abolir leur pouvoir infectieux en empêchant leur attachement aux cellules cibles et ainsi inhibant l'entrée du virus (Legendre et al., 1996; Soelder et al., 1989). De plus, il a été démontré que le complément peut lyser directement les virus enveloppés tels que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Stoiber et al., 1997).

La sensibilité des virus au complément humain peut dépendre de l'espèce et/ou de la lignée cellulaire dans laquelle les virions ont été générés en plus de l'identité même de leur glycoprotéine d'enveloppe (Takeuchi et al., 1997; Takeuchi et al., 1996). C'est entre autres le cas des rétrovirus cultivés en cellules murines ou canines qui deviennent susceptibles à l'inactivation par le complément (Pensiero et al., 1996; Rigg et al., 1996; Takeuchi et al., 1994). L'inducteur principal d'attaque du complément dans ces circonstances s'avère provenir de la reconnaissance par les anticorps humains d'épitopes α -(1,3)-galactosyl (α -Gal) présent à la surface des cellules de mammifères inférieurs (Rollins et al., 1996; Takeuchi et al., 1997; Takeuchi et al., 1996). La glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculaire (VSV), quant à elle, induit l'inactivation du virus par le complément, principalement via la voie classique et ce, indépendamment du type cellulaire utilisé pour sa production (Beebe and Cooper, 1981; DePolo et al., 2000).

Les virus ont tout de même évolué de telle manière à pouvoir retarder ou contrer leur inactivation par le complément (Stoermer and Morrison, 2011). En effet, certains virus enveloppés peuvent recruter différentes protéines régulatrices du complément présentes à la surface de la cellule infectée lors de leur bourgeonnement (Cummings et al., 2007). Parmi ceux-ci, notons le virus de l'influenza, le virus de la vaccine ainsi que le VIH qui sont aptes à incorporer les protéines régulatrices CD55, CD59 et/ou CD46 dans leur virion (Saifuddin et al., 1997; Shaw et al., 2008; Vanderplasschen et al., 1998). D'autres études ont aussi démontré que le VSV, qui active et est neutralisé par le complément d'une façon dépendante ou non des anticorps (Beebe and Cooper, 1981; Mills et al., 1979), peut lui aussi incorporer le CD46 afin de retarder sa neutralisation ou encore le CD55 qui a un effet plus important sur la protection du virus (Johnson et al., 2012). Récemment, un autre virus a été démontré comme étant apte à contrer directement le complément. Le virus de l'hépatite C (HCV) peut

effectivement inhiber activement la protéine C9 empêchant alors la formation du MAC (Kim et al., 2013).

2.4.2 Rôles du complément dans le cancer

On sait maintenant que le complément joue un rôle important dans les processus inflammatoires et sert même de système de surveillance immunologique afin de discriminer les cellules saines des débris cellulaires, cellules apoptotiques ou bien entendu des pathogènes étrangers. Par contre, son potentiel ne s'arrête pas là. Le complément peut participer dans les processus de maturation synaptique, l'angiogenèse, la mobilisation de progéniteurs de cellules souches hématopoïétiques, la régénération tissulaire et même le métabolisme des lipides (Mastellos and Lambris, 2002; Rutkowski et al., 2010a; Rutkowski et al., 2010b). Il devient donc évident que la délicate balance entre l'activation et l'inhibition des protéines du complément ne doit pas être perturbée afin d'éviter l'induction d'une attaque envers le soi (Ricklin et al., 2010).

En ce qui a trait au cancer, le système du complément montre alors une réelle dichotomie de fonction. D'un côté, des évidences démontrent que le complément limiterait la croissance tumorale par cytotoxicité dépendante du complément ou par cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (Gelderman et al., 2004; Ostrand-Rosenberg, 2008a). Plusieurs études ont d'ailleurs démontré l'intérêt de bloquer certaines molécules inhibitrices du complément avec des anticorps monoclonaux afin d'augmenter la lyse des cellules tumorales (Allendorf et al., 2005; Gelderman et al., 2002; Sier et al., 2004). Cependant, plusieurs types de tumeur peuvent contrecarrer les attaques par le complément en exprimant les protéines régulatrices CD46, CD55 ou CD59, comme c'est entre autres le cas du mélanome murin B16 (Donin et al., 2003; Elvington et al., 2012; Fishelson et al., 2003; Jurianz et al., 1999).

D'un autre côté, plusieurs études démontrent que le système du complément promeut l'oncogenèse (**Tableau 3**). Les molécules C3a et C5a ont d'ailleurs été rapportées comme ayant des propriétés prolifératives (Mastellos and Lambris, 2002; Rutkowski et al., 2010a). De plus, il a été démontré que ces anaphylatoxines sont aptes à augmenter l'activation de la

phosphatidyinositol 3-kinase (PI3K), de la kinase Akt ainsi que de la cible mammifère de la rapamycine (mTOR), trois protéines fortement associées à des néoplasies en contexte de surexpression (Corradetti and Guan, 2006; Markiewski et al., 2009; Venkatesha et al., 2005; Vivanco and Sawyers, 2002). Une autre étude d'implantation de tumeurs sous-cutanée en modèle murin dans des souris déficientes en protéines C3 ou C4 a également démontré une moindre prolifération des cellules cancéreuses associée à des dépôts de sous-produits de C3 dans la vasculature tumorale (Markiewski et al., 2008).

Le gène de réponse au complément-32 (RGC-32), pouvant être induit par le facteur de transcription p53, semble jouer quant à lui un rôle dans la progression du cycle cellulaire induit par le MAC (Badea et al., 2002; Badea et al., 1998; Saigusa et al., 2006). Fait intéressant, la protéine RGC-32 semble être surexprimée dans plusieurs types de tumeurs en comparaison avec les tissus sains correspondants (Fosbrink et al., 2005). De plus, RGC-32 semble être régulé, entre autres, par le *transforming growth factor- β* (TGF- β), protéine pouvant aussi être induite par le complément (Gionanlis et al., 2008; Huang et al., 2009; Li et al., 2007). Le TGF- β peut être sécrété directement par certain cancer et ainsi contribuer à augmenter le potentiel angiogénique, invasif et métastatique en plus de pouvoir supprimer les lymphocytes T cytotoxiques (Derynck et al., 2001; Derynck et al., 1987; Dickson et al., 1987). Ces lymphocytes T CD8⁺ peuvent également être inhibés par l'action des cellules myéloïdes suppressives (MDSC) qui sont recrutées au site tumoral suite à la liaison du C5a sur leur récepteur de surface C5aR (Markiewski et al., 2008).

Tableau 3. Contributions spécifiques de certaines protéines du complément au phénomène néoplasique.
Adapté de (Rutkowski et al., 2010c).

<i>Protéine du complément</i>	<i>Effet tumorigénique</i>	<i>Marque tumorigénique</i>
C3	Production de VEGF Réorganisation de la matrice extracellulaire Désintégration de la matrice extracellulaire	Angiogenèse Invasion et migration Invasion et migration
C3a	Activation de ERK1/2, Akt Induction d'IL-6 Production de VEGF Réorganisation de la matrice extracellulaire Chimiotaxie cellulaire	Mitogénèse Facteur de croissance et production de cytokines Angiogenèse Invasion et migration Invasion et migration
C5	Induction de TGF- β , IGF et IGFBP Désintégration de la matrice extracellulaire	Facteur de croissance et production de cytokines Invasion et migration
C5a	Activation de ERK1/2, Akt, JNK, p38, MAPK, phospholipase C β -2, phospholipase D, PKC, NF- κ B Stimulation de HGF Transactivation de EGFR Induction des cyclines E et D1 Induction d'IL-6 Inhibition de la caspase-3 Production de VEGF Chimiotaxie cellulaire Inhibition des lymphocytes T CD8 ⁺ Migration de MDSC et production d'espèces réactives d'oxygène/azote Désintégration de la matrice extracellulaire	Mitogénèse Facteur de croissance et production de cytokines Mitogénèse et migration cellulaire Mitogénèse Facteur de croissance et production de cytokines Prévention de l'apoptose Angiogenèse Invasion et migration Immunosuppression antitumorale Immunosuppression antitumorale
C9	Désintégration de la matrice extracellulaire	Invasion et migration
MAC	Induction de CDK 2 et 4, p21, RGC-32 Activation de ERK, p38, MAPK, JNK, PI3K, Ras, JAK-STAT Activation de c-jun, junD et c-fos Induction de bFGF, PDGF et TGF- β Inhibition des caspases 3 et 8, BAD, BID, TNF- α , FasL Induction de bcl-2 et IGF-I Production de VEGF	Mitogénèse Mitogénèse Mitogénèse Facteur de croissance, production de cytokines et angiogenèse Prévention de l'apoptose Prévention de l'apoptose Angiogenèse

Abréviations : BAD, bcl-1/bcl-2-associated death promoter; Bcl-2, B-cell lymphoma-2; bFGF, basic fibroblast growth factor; BID, B13 interacting-domain death agonist; CDK, cyclin-dependant kinase; EGFR, epidermal growth factor receptor; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FasL, Fas ligand; HGF, hepatocyte growth factor; IGF, insulin-like growth factor; IGFBP, insulin-like growth factor binding protein; IL-6, interleukine-6; JAK-STAT, Janus activated kinase-signal transducer and activated transcription; JNK, c-jun amino terminal kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MDSC, myeloid-derived suppressor cells; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PDGF, platelet-derived growth factor; PKC, protein kinase C; TGF- β , transforming growth factor- β ; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; VEGF, vascular endothelial growth factor.

3. Les virus oncolytiques

Bien que plusieurs nouveaux médicaments anticancéreux aient vu le jour dans les dernières décennies, rendant la chimio et radiothérapie plus agressive, le taux de survie général dans les cas de cancers métastatiques ne s'est pas significativement amélioré. Ceci a par contre jeté le doute sur l'efficacité réelle de ces types de traitements et a mis l'accent sur le besoin d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques (Vähä-Koskela et al., 2007). Ce sont pour ces raisons que la notion de thérapie synergétique mutuelle tend à prendre place (Mantwill et al., 2006). Ce concept implique en fait la recherche de nouveaux agents thérapeutiques qui pourront être utilisés de concert avec les thérapies classiques afin de bonifier les effets positifs tout en minimisant les effets secondaires néfastes. La virothérapie oncolytique est une de ces nouvelles stratégies qui a entre autres l'avantage d'être dynamique et ciblée. Le but à atteindre est donc la génération d'un milieu pro-inflammatoire créée par l'infection virale au site tumoral qui permettra de briser la tolérance face aux antigènes tumoraux en recrutant des cellules immunitaires en présence de signaux activateurs adéquats.

3.1 Historique de l'oncolyse virale

Le concept voulant que certains virus soient capables d'éradiquer divers cancers existe depuis le début du vingtième siècle. En effet, plusieurs observations rétrospectives de régressions spontanées de cancer des suites d'infections virales ont vite mené les chercheurs à considérer ces nouveaux agents thérapeutiques (**Figure 4**). Cependant, malgré que ces premières recherches aient démontré le potentiel thérapeutique chez l'humain, l'efficacité de la virothérapie fut décevante et plusieurs effets secondaires sévères ont mis fin prématurément aux études cliniques. Ceci contribua au déclin de l'intérêt pour les virus oncolytiques dans les années suivantes. Ce ne fut que dans les années 90, avec l'avancement de la biotechnologie et l'arrivée de la thérapie génique que la recherche en virothérapie oncolytique reprit du service pour devenir le domaine complexe et effervescent que nous connaissons aujourd'hui.

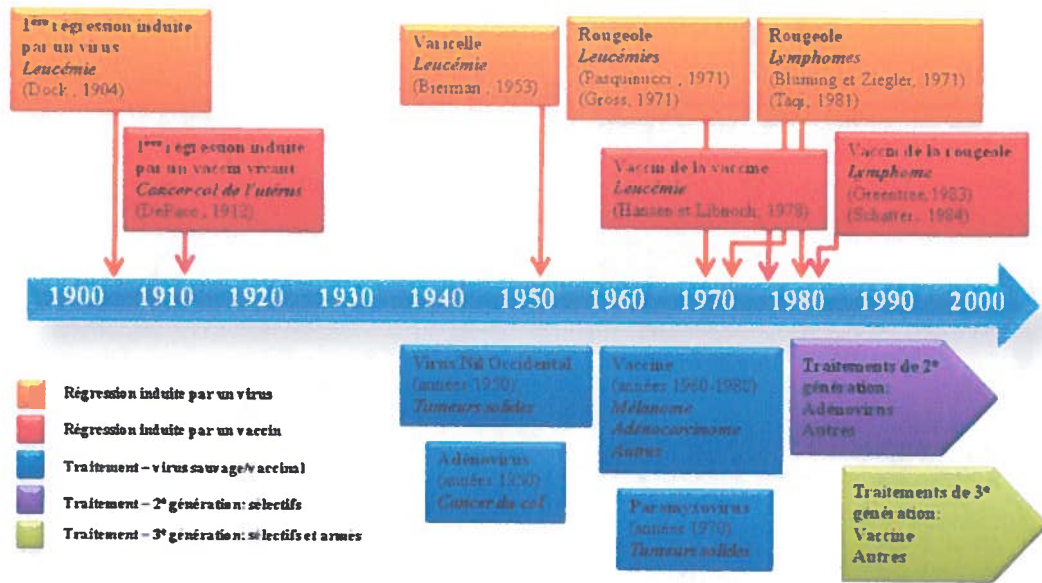


Figure 4. Historique de l'oncolyse virale. Le concept d'oncolyse virale est né tout d'abord d'après les observations cliniques de régressions spontanées de cancer suite à des infections (encadrés orangés) (Bierman, 1953; Bluming and Ziegler, 1971; Dock, 1904; Gross, 1971; Pasquinucci, 1971; Taqi, 1981) ou une vaccination (encadrés rouges) (DePace, 1912; Greentree, 1983; Hansen and Libnoch, 1978; Schattner, 1984). Dans les années 50, les expérimentations à base de virus en vue de thérapie oncolytique ont vu le jour (encadrés bleus). Vinrent ensuite les traitements dits de deuxième génération utilisant des virus modifiés génétiquement afin d'accroître leur sélectivité envers les cellules tumorales (encadré mauve), puis les traitements de troisième génération avec des virus sélectifs armés, pouvant alors délivrer des gènes d'intérêts (encadré vert). Adapté de (Liu et al., 2007).

3.2 La sélectivité tumorale

Au cours de l'évolution, les virus se sont développés de façon à tirer avantage de la machinerie cellulaire pour leur réplication. Parallèlement, les cellules tumorales se développent en acquérant ou perdant certaines fonctions afin d'échapper au contrôle normal de division. En augmentant leur potentiel prolifératoire, elles peuvent simultanément perdre des composantes intracellulaires critiques dans leurs mécanismes de défense et ainsi devenir des cibles privilégiées à l'infection par certains virus (Figure 5).

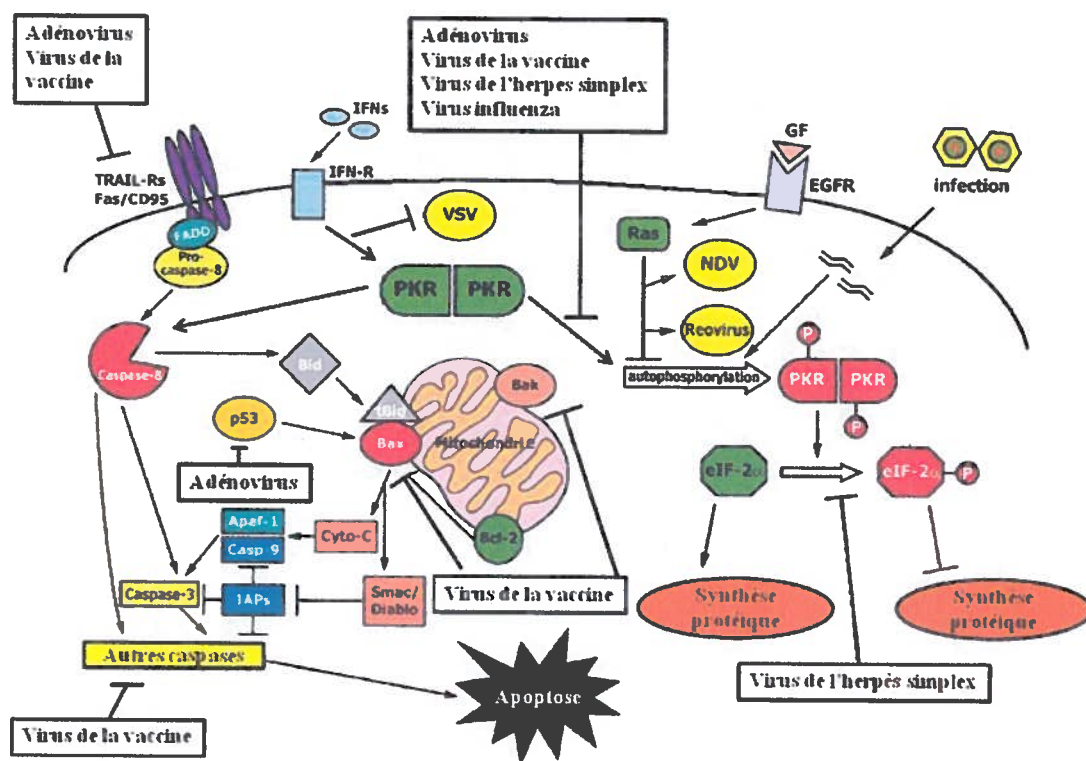


Figure 5. Interaction de certains virus oncolytiques avec le métabolisme cellulaire. Intervention de divers virus avec les voies cellulaires de l'apoptose, la signalisation par l'interféron et EGFR/Ras. Adapté de (Guo et al., 2008). Abréviations : Apaf-1, Apoptotic peptidase activating factor 1; Bak, Bcl-2 homologous antagonist killer; Bax, Bcl-2-associated X protein; Bcl-2, B-cell lymphoma-2 ; Bid, BH3 interacting-domain death agonist; Casp-9, caspase-9; Cyto-C, cytochrome c; eIF-2 α , Eukaryotic translation initiation factor 2 α ; EGFR, Epidermal growth factor receptor; FADD, Fas-Associated protein with Death Domain; GF, growth factor; IAPs, Inhibitors of apoptosis; IFNs, Interférons; IFN-R, récepteur à l'interféron; NDV, Newcastle disease virus; PKR, protéine kinase R; tBid, Bid tronqué; TRAIL-Rs, récepteurs du tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand; VSV, Vesicular stomatitis virus.

3.2.1 Voies de signalisation p53/RB

La voie de signalisation impliquant le facteur de transcription p53 et/ou la protéine du rétinoblastome (RB) a rapidement été identifiée comme déficiente chez plusieurs types de cellules transformées. Les adénovirus comportent la protéine E1B qui leur permet de lier et d'inactiver le facteur p53 afin de se répliquer dans les cellules saines. Le variant ONYX-015 quant à lui détient une mutation dans cette protéine et génère donc une réponse p53 menant à l'apoptose de la cellule lors de l'infection. Cependant, les cellules tumorales déficientes au niveau du gène *p53* ne peuvent plus limiter la réplication virale (Liu and Kim, 2005). Les virus ayant donc pour cibles des protéines proapoptotiques, comme les adénovirus et le virus

de la vaccine, peuvent être mutés spécifiquement afin de se répliquer sélectivement dans les cellules cancéreuses souvent déficientes dans ces mécanismes d'induction de l'apoptose. Dans le même ordre d'idée, la protéine E1A des adénovirus cible la protéine RB, protéine suppressive de tumeur. Comme celle-ci est également dérégulée dans la majorité des cellules transformées, une mutation du gène *E1A* confère au virus une spécificité tumorale (Fueyo et al., 2000; Heise et al., 2000; Sherr, 1996). Il en va de même pour l'infection des cellules souches cancéreuses, considérées comme critique dans l'initiation et la progression tumorale autant dans les cas de leucémie ou de masses solides, lesquelles ont pu être spécifiquement infectées dans une étude de traitement du cancer du sein puisqu'elle s'avaient aussi être déficientes dans la voie de signalisation RB (Eriksson et al., 2007).

3.2.2 Voie de signalisation de l'interféron

Un autre défaut génétique fréquent des cellules cancéreuses est au niveau de la voie de signalisation des interférons de type I (IFN) (Obuchi et al., 2003; Stojdl et al., 2003). Ces interférons agissent en tant que cytokines antivirales induites et sécrétées lors de l'infection par certains virus via l'activation de récepteurs de type Toll (TLR) et/ou la reconnaissance d'intermédiaires de réplication virale sous forme d'acides ribonucléiques (ARN) double brin. L'activation de la voie de l'interféron suite à la liaison de la cytokine sur son récepteur cellulaire permet l'activation de la voie *Janus activated kinase (JAK)- signal transducer and activator of transcription (STAT)*. Les STAT phosphorylées vont pouvoir transloquer dans le noyau et se lier à la protéine p48 pour former le complexe *interferon-stimulated gene factor 3 (ISGF3)* qui pourra se lier aux éléments de séquence répondant à l'interféron (IRSE) et ainsi activer la transcription de gènes cibles (Gongora and Mechti, 1999). Parmi ceux-ci, on retrouve les gènes codant pour la protéine PKR permettant d'inhiber la synthèse protéique, la RNase L pour dégrader les ARN messagers cellulaires et viraux, Mx interférant avec l'ARN-polymérase ARN-dépendante virale et le groupe de protéines P200 participant à l'inhibition de la prolifération cellulaire (Kufe et al., 2003).

Le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) est un bon exemple de virus excessivement sensible à l'IFN. Puisque la protéine de la matrice de ce virus permet de bloquer l'exportation

d'ARN messager et donc d'inhiber la sécrétion d'IFN, des mutations au niveau de cette protéine permettent la réplication du virus spécifiquement dans les cellules tumorales incapables de synthétiser ces cytokines (Stojdl et al., 2000a; Stojdl et al., 2003). Il a également été démontré qu'une mauvaise régulation de la traduction en plus des défauts de signalisation d'IFN contribuait grandement à la réplication du VSV (Balachandran and Barber, 2004; Obuchi et al., 2003). Par la suite, une étude démontra que l'activation constitutive de la voie de signalisation Ras / Raf1 / *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) / *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) jouait un rôle important dans la signalisation inefficace de l'IFN dans environ 30% des cancers (Noser et al., 2007). En effet, l'activation de cette voie régule négativement la réponse à l'IFN et permet alors la propagation autant du VSV que du virus de la vaccine, lui aussi sensible à cette molécule antivirale (Battcock et al., 2006). Parallèlement, le *Newcastle disease virus* (NDV) semblerait lui aussi détenir des propriétés intrinsèques d'oncolyse, et ce au moins en partie dans les cellules transformées déficientes en interféron (Lorence et al., 1988; Reichard et al., 1992).

3.2.3 Voie de signalisation de la protéine kinase R

La voie de signalisation de défense cellulaire médiée par la protéine kinase R (PKR) peut également être exploitée en vue de virothérapie oncolytique. En temps normal, cette voie inhibe la synthèse protéique des cellules saines infectées. Les cellules tumorales ayant une suractivité des MAPK peuvent donc supporter la réplication du virus de l'herpès simplex-1 ayant une délétion du gène $\gamma 34.5$ via l'inhibition de la voie PKR (Smith et al., 2006; Veerapong et al., 2007). Le virus de l'influenza A a aussi été l'objet de recherche en vue d'une virothérapie. Sa protéine NS1 est un facteur de virulence qui contrecarre la réponse antivirale induite par PKR. Dans les cellules tumorales ayant une voie de signalisation Ras constitutivement activée, PKR est inhibée et le virus arborant une délétion du cadre de lecture ouvert du gène *NS1* peut s'y répliquer spécifiquement (Bergmann et al., 2001).

3.2.4 Voie de signalisation du récepteur au facteur de croissance/Ras

Finalement, plusieurs études ont démontré que le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) était surexprimé dans une grande variété de tumeurs et que cette

expression corrélait avec un mauvais pronostic. Les facteurs de croissance (GF), en se liant à leurs récepteurs, induisent leur oligomérisation et activent la signalisation par les tyrosines kinases. Dans les cellules tumorales, une hyperactivation de cette voie mène à l'activation subséquente de la voie Ras (Guo et al., 2008). Les réovirus humains sont maintenant connus pour tirer avantage de l'activation de cette voie pour leur réplication (Coffey et al., 1998; Norman et al., 2004).

3.3 La grande variété d'agents viraux

De plus en plus d'études épidémiologiques indiquent que la vaccination contre des pathogènes communs, tels l'influenza, la variole ou la tuberculose, peut réduire les risques de développer un mélanome dans le courant de la vie (Kölmel et al., 2005; Krone et al., 2003; Mastrangelo et al., 2000). Cela semble donc dire que certains virus atténués détiennent des propriétés intrinsèques leur permettant de jouer un rôle bénéfique dans la lutte contre le cancer. Ceci ouvre alors la porte à l'étude d'une grande variété de virus pouvant maintenant servir d'outil thérapeutique antitumoral.

3.3.1 Les adénovirus

Les adénovirus appartiennent à la famille des *Adenoviridae* et peuvent être divisés en deux genres; les *Mastadenovirus* et les *Aviadenovirus*. Le premier genre inclut les virus de plusieurs mammifères (virus humains, simiens, murins, bovins, canins et bien d'autres) tandis que le deuxième genre est restreint au virus s'attaquant aux oiseaux. Le premier virus de cette famille a été isolé en 1953 à partir de cellules primaires d'amygdales humaines en culture qui semblaient dégénérer d'elles-mêmes (Rowe et al., 1953). Depuis, quarante-neuf sérotypes humains ont été identifiés sur la base de leur résistance à la neutralisation par de l'antisérum d'un autre sérotype d'adénovirus. Maintenant, les adénovirus font partie des virus les plus étudiés entre autres pour de la thérapie génique (tous du sérotype 5). Des progrès significatifs ont même débouché sur l'acceptation en Chine du premier virus oncolytique approuvé en clinique, le H101 pour les cancers de la tête et du cou (Garber, 2006).

La virothérapie à base d'adénovirus repose principalement sur la modification de leur gène immédiat précoce *E1*. En effet, les protéines E1A et E1B résultantes forcent la cellule infectée à entrer en phase S pour assurer la réplication virale. La délétion de E1A rend donc le virus susceptible au mécanisme antiviral du RB qui bloque la transition de la phase G₁ à S. D'un autre côté, la délétion de E1B permet au facteur p53 d'induire l'apoptose des cellules infectées, comme c'est le cas avec un des vecteurs les plus utilisés ONYX-015 (Ganly et al., 2000; Georger et al., 2002; Nemunaitis et al., 2001; Rogulski et al., 2000). Les adénovirus génétiquement modifiés peuvent donc se répliquer préférentiellement dans les cellules tumorales déficientes dans les voies RB ou p53 (Jiang et al., 2006). Des études ont toutefois démontré que l'efficacité oncolytique était supérieure avec les mutants E1A (Fueyo et al., 2000; Heise et al., 2000). Afin d'augmenter encore plus leur spécificité, une équipe a donc créé un adénovirus E1A⁻ exprimant p53, ce qui augmente la réplication dans les cellules déficientes en p53 tout en y induisant l'apoptose afin de faciliter la libération de nouveaux virions (van Beusechem et al., 2002). Ce virus a d'ailleurs été commercialisé sous le nom ADVEXIN™ chez Introgen Therapeutics Inc.

3.3.2 Les virus herpès

Un autre virus intensivement étudié en virothérapie oncolytique est le virus de l'herpès simplex-1 (VHS-1). Le premier vecteur herpétique répliatif utilisé à des fins de thérapies anti-cancéreuses, le mutant *Δ*lsp_{tk} de la souche F, fut pour le traitement de gliomes humains en 1991 (Martuza et al., 1991). Arborant une délétion dans le gène de thymidine kinase, ce virus fut abandonné puisque l'absence de ce gène rend le virus impossible à contrôler avec les médicaments anti-herpétiques conventionnels, ce qui éliminait la possibilité de rendre ce vecteur commercial. Les études se sont donc tournées principalement vers la délétion du gène majeur de neurovirulence γ 34.5, ce qui restreint la possibilité de réplication du virus dans le système nerveux central et ainsi de rentrer en latence (Markert et al., 2000). Puisque cette délétion affecte également la réplication, des virus de deuxième et de troisième génération ont vu le jour afin de limiter cette atténuation. Une délétion du gène *ICP47* permet d'augmenter l'efficacité répliative en plus de minimiser la régulation à la

baisse des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe-I (CMH-I) à la surface des cellules infectées et ainsi améliorer l'immunogénéité du virus (Todo et al., 2001). Une autre grande percée en virothérapie oncolytique est le virus OncoVEX™ GM-CSF de la compagnie Amgen Inc. Ce virus comporte la délétion du gène γ 34.5, exprime des taux élevés de la protéine US11 pour améliorer sa réplication et exprime le facteur stimulateur de colonie des granulocytes-macrophages (GM-CSF) afin de stimuler une réponse immunitaire antitumorale systémique. Les données de l'étude clinique de phase III contre le mélanome humain devraient être disponibles d'ici la fin de 2013 (Russell et al., 2012).

3.3.3 Les poxvirus

Le virus de cette famille le plus communément utilisé est le virus de la vaccine atténué par la délétion entre autres du gène encodant la thymidine kinase (McCart et al., 2001). Un des virus réplicatifs les plus prometteurs, dérivé de la souche Wyeth, est le JX-594 exprimant aussi le GM-CSF (Pexa-Vec), de la compagnie Jennerex Biotherapeutics, Inc., qui a démontré un grand potentiel sur des tumeurs solides de même que des métastases suite à l'administration intraveineuse dans des modèles de rats et de lapins (Kim et al., 2006). Tout récemment, ce même virus a été utilisé en étude clinique de phase II dans des cas de carcinomes hépatocellulaires. Il en est ressorti une confirmation du potentiel oncolytique et immunothérapeutique du virus, une bonne réponse antitumorale et une augmentation de la survie des patients en fonction de la dose injectée (Heo et al., 2013).

3.3.4 Les réovirus

Les réovirus sont très communs dans les tractus respiratoire et gastro-intestinal avec une séropositivité de près de 100% chez l'humain, sans toutefois créer de maladie symptomatique. Malgré qu'ils aient des propriétés oncolytiques intrinsèques, leur forte prévalence dans la population pourrait influencer sur leur efficacité due à l'immunité préexistante chez les individus. Toutefois, des données récentes font état de la capacité des réovirus à s'associer avec des cellules immunitaires mononucléées et cette interaction permet

d'outrepasser leur neutralisation (Adair et al., 2013; Hall et al., 2012). Par ailleurs, un grand avantage de leur utilisation est leur innocuité bien établie.

La sélectivité de ce virus pour les cellules tumorales vient du fait que leur réplication est naturellement inhibée par l'enzyme PKR; la synthèse de la protéine $\sigma 1$ du virus y étant particulièrement sensible (Samuel and Brody, 1990). La protéine structurale majeure de réovirus, $\sigma 3$, peut toutefois contrecarrer partiellement l'action de PKR suite à son attachement à l'ARN double brin (Schiff et al., 1988). Cependant, dans les cellules tumorales ayant une protéine Ras constitutivement activée menant à l'inactivation de PKR, les réovirus peuvent se répliquer librement. Par contre, malgré son importance dans plusieurs modèles, certaines études démontrent que l'activation de Ras pourrait ne pas être suffisante pour l'oncolyse efficace par réovirus (Lemay et al., 2007).

Un réovirus de type 3 provenant de la souche Dearing vient d'être mené en étude clinique de phase I chez des patients atteints de divers types de masses solides accessibles ne répondant à aucun traitement antitumoral conventionnel (Morris et al., 2013). Ce même virus, le Réolysin[®] de la compagnie Oncolytics Biotech[®] Inc., est également en cours d'étude de phase clinique III en combinaison avec les agents chimiothérapeutiques paclitaxel et carboplatine dans des cas de cancer de la tête et du cou (étude # NCT01166542). Une trentaine d'autres études sont également en cours avec ce même agent.

3.3.5 Les orthomyxovirus

L'utilisation du virus Influenza à des fins de thérapie antitumorale date des années 1950 (Wagner, 1954). Dans certains cas, une vaccination contre l'Influenza a même démontré une certaine protection contre divers types de cancer (Mastrangelo et al., 2000). Des études se sont donc concentrées sur l'utilisation de virus mutants dans la protéine NS1 et pouvant se répliquer préférentiellement dans les cellules ayant une activité Ras constitutive (Bergmann et al., 2001). Plus récemment, une équipe en Allemagne a démontré les capacités oncolytique et immunostimulatoire d'un virus Influenza contenant le gène de l'interleukine (IL)-15 dans la séquence codante du segment NS permettant la lyse de cellules de mélanome et l'induction

de la lyse des cellules tumorales non infectées par les cellules *natural killer* (NK) (van Rikxoort et al., 2012).

3.3.6 Les paramyxovirus

Dans cette famille se retrouvent plusieurs virus oncolytiques à l'étude comme le virus de la rougeole, des oreillons et le NDV. Ces virus ont une sélectivité tumorale principalement dans les cellules incapables de générer une réponse antivirale adéquate par la sécrétion d'interféron de type I (Krishnamurthy et al., 2006). Les deux premiers virus dérivés des souches vaccinales vivantes atténuées sont commercialisés par la compagnie Merck. Le virus de la rougeole Moraten de même que le virus des oreillons Jeryl-Lynn ont prouvé leur efficacité dans un modèle murin de cancer ovarien humain intrapéritonéal (Myers et al., 2005). De plus, lorsque combinée au GM-CSF, une étude a aussi démontré l'efficacité du virus de la rougeole à guérir complètement plus d'un tiers des souris traitées ayant des adénocarcinomes du colon (Grossardt et al., 2013). On retrouve maintenant deux virus de la rougeole génétiquement modifiés, dérivés de la souche Edmonston B, en étude clinique de phase I d'administration intrapéritonéale chez des patientes atteintes de cancers ovariens récurrents (étude # NCT00408590). Selon l'Institut National du Cancer, le premier exprime comme peptide soluble l'antigène humain carcinoembryonique (MV-CEA), un antigène associé aux tumeurs, qui peut alors être détecté dans le sérum et utilisé comme marqueur de l'expression des gènes viraux. Le second exprime le symporteur thyroïdal d'iodure de sodium (MV-NIS). Suite à l'attachement et à la fusion de ce virus dans les cellules tumorales, le MV-NIS induit des syncytia et mène à la lyse des cellules. De plus, lorsque combinée à l'iode 123, l'expression du NIS facilite l'entrée du produit dans les cellules cancéreuses infectées et permet la visualisation non invasive de ces cellules.

Le virus NDV, quant à lui, a aussi fait son apparition pour une étude de phase I/II dans des cas de gliomes, sarcomes et neuroblastomes (étude # NCT01174537). Une étude récente fait mention que la protéine Rac1, impliquée dans la voie de signalisation PI3K pour le contrôle du cycle cellulaire et de la transcription génique, serait requise pour la réplication du NDV dans les cellules tumorales humaines (Puhlmann et al., 2010). Cependant, les

mécanismes fondamentaux impliqués dans l'infection des cellules cancéreuses par ce virus n'ont pas encore été clairement élucidés.

3.3.7 Les rhabdovirus

Cet ouvrage se concentrera principalement sur le prototype oncolytique représentant cette famille soit le virus de la stomatite vésiculaire (VSV). Ce virus peut infecter tout type de mammifère, en plus d'avoir la possibilité de se répliquer chez quelques insectes (Bilsel and Nichol, 1990; Shope and Tesh, 1987). Son large tropisme en fait donc un virus pouvant être utilisé pour traiter une grande variété de cancer et pouvant facilement être utilisé en modèle animal. L'infection humaine, généralement due à l'exposition à des animaux infectés ou à des accidents de laboratoire, est principalement asymptomatique, mais peut quelques fois créer des symptômes mineurs de type grippaux se manifestant sur quelques jours (Fields and Hawkins, 1967; Johnson et al., 1966).

Le génome du VSV est composé d'un simple brin d'ARN à polarité négative de 11 161 kb encodant 5 protéines : la nucléocapside (N), la phosphoprotéine (P), la protéine de la matrice (M), la glycoprotéine d'enveloppe (G) et la polymérase (L) (Lichty et al., 2004; Rose and Whitt, 2001; Wagner and Hewlett, 2004). Malgré le haut taux de mutations de ce virus à ARN, des études ont noté une stabilité génétique remarquable durant plusieurs années d'infections naturelles (Bilsel and Nichol, 1990; Bilsel et al., 1990; Steinhauer et al., 1989).

La souche sauvage de VSV induit des effets cytopathiques qui peuvent être atténués suite à l'action d'IFN ou lors de mutations dans le génome viral (Desforges et al., 2001). T1026, mutant thermosensible bien caractérisé et isolé de la souche parentale HR (Heat Resistant) du sérotype Indiana du VSV, comporte la substitution d'une méthionine par une arginine en position 51 des 229 acides aminés que constitue le gène encodant la protéine de la matrice (M) (Ferran and Lucas-Lenard, 1997; Francoeur et al., 1987). Cette protéine joue un rôle essentiel pour la survie du virus, allant de l'assemblage viral à l'interférence au niveau des programmes d'immunité innée de la cellule hôte en passant par la régulation partielle de la transcription virale (Ahmed and Lyles, 1998; Lichty et al., 2004; Lyles, 2000; Stojdl et al.,

2003). M joue également un rôle d'une grande importance au niveau de l'inhibition de l'expression génique cellulaire (Kopecky et al., 2001). De plus, M sauvage a la propriété de bloquer l'exportation d'ARNm du noyau cellulaire, ce qui entraîne l'induction de l'apoptose ainsi qu'une déficience au niveau de l'expression de l'IFN par la cellule (Lichty et al., 2004; Petersen et al., 2001). Les mutants viraux ayant une mutation dans M, comme T1026, induisent l'IFN puisque la protéine mutée ne peut plus bloquer son expression génique (Ahmed et al., 2003).

Il a par contre été démontré qu'une combinaison de la mutation dans M avec un phénotype thermosensible peut conduire les mutants viraux à la persistance dans les cellules, comme il a entre autres été établi avec T1026 dans les fibroblastes murins L929 (Desforges et al., 2001). Deux autres mutants thermosensibles, TP5 et TP6, se sont avérés incapables de persister dans les cellules hôtes (Desforges et al., 2002). Contrairement à la souche T1026 qui n'affecte que très peu la synthèse protéique cellulaire, TP5 et TP6 sont responsables d'une forte inhibition de ces mécanismes cellulaires (Desforges et al., 2001; Francoeur et al., 1987). Détenant tous les deux une protéine M sauvage, ces mutants viraux possèdent donc un avantage d'oncolyse puisque des études ont aussi démontré l'importance de cette protéine comme inductrice de réponses cellulaires contribuant à l'instauration d'une activité antitumorale (Zhao et al., 2008).

Le VSV est intensivement étudié à des fins thérapeutiques grâce à sa réplication dans virtuellement tout type de cellules. Sa grande sensibilité à l'IFN induit sa sélection préférentielle dans les cellules tumorales déficientes dans cette voie constituant près de 80% des types tumoraux humains (Balachandran and Barber, 2000, 2004; Desforges et al., 2001; Lichty et al., 2004; Stark et al., 1998). L'hypoxie est également une caractéristique communément rencontrée des masses tumorales solides généralement associées à la génération de métastases, à une résistance aux thérapies conventionnelles et à un mauvais pronostic pour les patients (Pouyssegur et al., 2006). Le VSV est apte à se répliquer dans ces conditions, ce qui démontre son potentiel à infecter les cellules tumorales hypoxiques (Connor et al., 2004). Le VSV vient d'ailleurs lui aussi de s'inscrire au palmarès des virus en

études cliniques avec un virus exprimant l'interféron- β afin de confirmer son innocuité chez des patients atteints de carcinome hépatocellulaire (étude # NCT01628640).

3.3.7.1 Article 1. « Le virus de la stomatite vésiculaire dans la lutte contre le cancer » (Med Sci (Paris). 2013; 29 : 175-82.)

Cet article décrit plus en détail le virus de la stomatite vésiculaire et son potentiel en virothérapie oncolytique. Il discute de son cycle de réplication, passe en revue les différents mutants utilisés et les avantages de ces derniers. Il fait également état de l'action des virus oncolytiques en général sur le système immunitaire et des percées réalisées dans ce domaine.

Il est tout de même primordial de mentionner qu'au moment de l'écriture de cette synthèse, le récepteur d'entrée du VSV n'avait pas encore été identifié. Tout récemment, ce dernier a été découvert. Il a été démontré que le récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDLR) serait le port d'entrée majeur du VSV et que d'autres membres de la famille des LDLR pourraient servir alternativement, quoique moins efficacement, à son internalisation dans les cellules humaines et murines (Finkelshtein et al., 2013). Les membres de cette famille de récepteurs sont exprimés de façon ubiquitaire sur toutes les cellules au travers du règne animal complet (Willnow, 1999), ce qui corrèle avec le remarquable pantropisme du VSV. De plus, le foie et plusieurs types de cellules tumorales ont démontré exprimer des taux très élevés de LDLR (Lum et al., 1999) et pourraient être des cibles de choix en vue de virothérapie.

Contribution des différents auteurs

VJ : Rédaction de l'article

LP : Supervision et rédaction de l'article

AL : Supervision et rédaction de l'article

**LE VIRUS DE LA STOMATITE VÉSICULAIRE DANS LUTTE
CONTRE LE CANCER**

VESICULAR STOMATITIS VIRUS IN THE FIGHT AGAINST CANCER

Valérie Janelle^{1,3}, Laurent Poliquin^{2,3}, Alain Lamarre^{1,3}

Affiliations : ¹ Laboratoire d'Immunovirologie, Institut national de la recherche scientifique, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada

² Département de Sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada

³ Centre de Recherche Biomed, Montréal, Québec, Canada

Correspondance : A. Lamarre, Laboratoire d'Immunovirologie, Institut national de la recherche scientifique, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

Téléphone : 450-687-5010 poste 4262

Fax : 450-686-5501

Courriel : alain.lamarre@iaf.inrs.ca

RÉSUMÉ

Le cancer est une maladie aux multiples facettes qui touche de plus en plus de personnes à travers le monde. L'utilisation de virus pour éliminer sélectivement les cellules cancéreuses s'avère être une nouvelle avenue thérapeutique prometteuse. Certains virus, dont celui de la stomatite vésiculaire (VSV), sont des prototypes intensivement étudiés dans cette optique. Une meilleure compréhension des mécanismes d'infection et de recrutement du système immunitaire, dans un contexte de virothérapie oncolytique, pourra s'avérer très utile pour le développement de nouvelles stratégies sécuritaires et efficaces dans le traitement du cancer.

Mots clés : VSV, virothérapie, cancer

ABSTRACT

Cancer is a complex disease that affects more and more people around the world. Unfortunately, existing treatments are only partially efficient and often induce major side effects. Thus, the use of viruses to selectively kill cancer cells is a new promising therapeutic approach. Recently, VSV has been used in oncolytic virotherapy because of its capacity to preferentially infect most human tumor cells. However, despite the availability of good oncolytic VSV mutants, the large variability of tumor cell types and the multiple ways in which they can evade viral infection suggests that therapeutic combinations of various viruses will be necessary to efficiently treat most cancers. A better understanding of the infection mechanisms and immune system recruitment by oncolytic viruses will be of great value for the development of safe and efficient strategies for cancer treatment.

Key words : VSV, virotherapy, cancer

Un virus depuis longtemps étudié

Notre connaissance des virus ne date pas d'hier! Que l'on attribue la paternité de cette découverte à Pasteur et Koch suite à leur théorie germinale de 1880, à Dimitri Iwanowski en 1892 et ses plants de tabac ou encore à Martinus Beijerinck en 1898 et sa vision plus moderne de *contagium vivum fluidum* (agent vivant infectieux), ces particules se sont méritées beaucoup d'attention depuis de nombreuses décennies. Le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) est d'ailleurs un prototype ayant été étudié intensivement. Il a en effet contribué à autant de découvertes de processus cellulaires que viraux.

Membre de la famille des Rhabdoviridae, le VSV n'est pas endémique en Amérique du Nord et généralement asymptomatique chez les humains (Letchworth et al., 1999; Rose and Whitt, 2001). C'est un virus enveloppé en forme de balle de fusil contenant un génome d'ARN de polarité négative encodant cinq protéines soit : la nucléocapside (N), la phosphoprotéine (P), la protéine de la matrice (M), la glycoprotéine d'enveloppe (G) ainsi que l'ARN-polymérase ARN-dépendante (L) (Lichty et al., 2004; Rose and Whitt, 2001). On connaît maintenant beaucoup de détails sur le cycle de réplication du VSV qui peut infecter une grande variété de types cellulaires et d'espèces diverses (Figure 1).

Il a été démontré récemment que l'entrée se fait via la base du virus suite à l'attachement d'un trimère de glycoprotéines à son récepteur encore inconnu (Libersou et al., 2010). Cette liaison induit l'internalisation du virion par endocytose dépendante de la clathrine et aidé d'une polymérisation de l'actine (Cureton et al., 2009). Des études de cristallographie ont démontrés qu'une fois l'endosome formé, l'acidification de la vésicule génère un changement de conformation de la protéine G. Cela lui permet une interaction avec la membrane et l'enclenchement du processus de fusion (Albertini et al., 2012). Ce changement d'état de la protéine G dépendante du pH est réversible et une conformation post-fusion inactive sera retrouvée par la suite (Roche et al., 2007).

La fusion du virus à l'endosome permettra ensuite le relargage du matériel génétique dans le cytoplasme de la cellule hôte. Dès lors, la polymérase virale aidée de trois phosphoprotéines formera une transcriptase capable de générer de façon asymétrique les

ARNm des cinq protéines virales. Elle sera également responsable d'ajouter une coiffe 5' méthylée et une queue poly-(A) sans qu'aucune protéine cellulaire ne soit requise (Jayakar et al., 2004). Lorsque le niveau de nucléoprotéine traduite sera assez élevé, celle-ci se combinera avec une phosphoprotéine et la polymérase afin de former la réplicase qui permettra de redonner un brin d'ARN négatif à partir d'un patron positif. D'autres études de cristallographie ont permis de déterminer que P agit comme une chaperonne en conduisant N au site de réplication virale et en la stabilisant avec la polymérase assise sur l'ARN. Puis, la protéine N va se lier directement à l'ARN pour former un complexe oligomérique de haut poids moléculaire en forme d'anneau encapsidant le génome en son centre chargé positivement afin qu'il soit résistant à la dégradation par les RNAses (Zhang et al., 2008).

Finalement lors du bourgeonnement, la protéine M, à qui l'on doit la forme particulière en balle de fusil, pourra s'associer avec G à la surface cellulaire (Lyles et al., 1996). Cette dernière, via son domaine cytoplasmique, servira alors de signal de reconnaissance pour le complexe ARN-N et complètera l'assemblage du virus, toujours aidé par l'association avec M (Dancho et al., 2009).

Une protéine aux multiples applications

Beaucoup d'études ont permis d'en apprendre davantage sur les différentes protéines du VSV. En effet, la protéine de la matrice (M), la plus petite mais la plus abondante du virion, est maintenant considérée comme la protéine clé pour l'assemblage, le bourgeonnement ainsi que l'induction d'effet cytopathique par le VSV (Jayakar et al., 2004; McCreedy and Lyles, 1989). De ce fait, il a été démontré que M était responsable de l'arrondissement des cellules infectées probablement dû à sa capacité d'interaction avec la tubuline (Blondel et al., 1990; Melki et al., 1994).

D'autres études ont également établi que M joue un rôle important dans l'inhibition de la transcription et de la traduction cellulaire via son interaction avec le complexe de polymérase cellulaire (Ahmed and Lyles, 1998) et le complexe d'initiation eIF4F (Connor and Lyles, 2002) respectivement. D'autres particularités importantes de ce virus viennent du fait que la protéine de la matrice peut bloquer le transport nucléocytoplasmique d'ARNm par son interaction avec la protéine nucléaire NUP98 (Petersen et al., 2000). Lorsque mutée sur la

méthionine 51 (M_{M51R}), l'interaction avec les nucléoporines est inhibée, permettant aux cellules infectées de sécréter l'interféron de type I (IFN) (Garcia-Sastre and Biron, 2006; Stojdl et al., 2003). Ce virus est toutefois atténué en comparaison avec la souche virale parentale, démontrant une inhibition de la transcription et traduction cellulaire altérée (Ahmed et al., 2003).

D'autres mutations bien avantageuses

Plusieurs études ont aussi relevé différents rôles de la glycoprotéine d'enveloppe du VSV. En plus de servir à l'attachement et à la fusion membranaire, sa liaison à la protéine M permet d'accroître l'efficacité de bourgeonnement des particules virales (Ge et al., 2010). Toutefois, outre sa participation dans l'assemblage des virions, il a été démontré que cette protéine pourrait induire de la cytotoxicité (Hoffmann et al., 2010) et sous certaines conditions, l'oncolyse (Wollmann et al., 2010).

Des mutations dans la glycoprotéine du VSV ont aussi été associées à un bon potentiel oncolytique. Les mutants G_5 , G_{5R} , G_6 and G_{6R} , de l'isolat San Juan du sérotype Indiana sont entre autres des virus à l'étude. Leur isolement sans mutagenèse selon leur phénotype de petite plaque de lyse sur des cellules pouvant produire de l'interféron lors de l'infection, mais faisant des plages normales sur des cellules déficientes en IFN, suggère leur potentiel à induire cette molécule antivirale (Francoeur et al., 1987). De plus, les mutants G_5 et G_6 s'avèrent être thermosensibles, probablement dû à la substitution d'un acide aspartique en position 216 par une glycine qui éliminerait un lien ionique stabilisant la protéine, tandis que les mutants révertants G_{5R} et G_{6R} ont retrouvé leur résistance à des températures avoisinant les 40°C. Ces mutants de la glycoprotéine du VSV sont des candidats très intéressants pour la recherche en oncolyse virale puisqu'ils se répliquent et affectent le métabolisme cellulaire de façon analogue au virus sauvage tout en permettant la sécrétion d'IFN dans des fibroblastes murins, ce qui laisse présager une bonne protection des tissus sains avoisinant une tumeur (Janelle et al., 2011) (Figure 2).

L'induction de différents types de mort cellulaire

Au début des années 2000, plusieurs équipes ont pu établir un rôle direct de la protéine de la matrice dans l'induction de l'apoptose des cellules infectées suite au stress occasionné par le blocage de l'exportation d'ARNm du noyau et la diminution subséquente de la synthèse protéique (Desforges et al., 2002; Kopecky et al., 2001). En se concentrant sur les nouvelles propriétés attribuées à la glycoprotéine d'enveloppe du VSV, notre laboratoire a également pu démontrer que certaines mutations sur cette protéine peuvent contribuer à l'induction rapide et efficace de la mort cellulaire dans plusieurs types de cellules tumorales (Figure 3) et ce, en raison d'une augmentation de l'apoptose des cellules infectées (Janelle et al., 2011).

Avec le temps, les caractéristiques phénotypiques de l'apoptose ont été approfondies et un nouveau concept a vu le jour. L'apoptose immunogénique implique principalement l'exposition de la calréticuline à la surface cellulaire, le relargage de HSP (heat shock protein) ou encore de HMGB1 (high-mobility group box 1 protein). L'expression de ces protéines permet, entre autres, aux cellules dendritiques de reconnaître les cellules mourantes et d'initier une réponse immunitaire contre ces dernières. Nous avons d'ailleurs démontré que l'infection par VSV permet une augmentation significative de l'exposition de calréticuline à la surface cellulaire. Cette induction d'apoptose immunogénique semble dépendre entre autres de la protéine M puisque la souche mutante M_{M51R} ne permet pas une telle augmentation (Figure 4).

La protéine G a elle aussi été associée à l'induction de l'apoptose. Lors de son expression à la surface des cellules infectées, elle mène à la fusion pH-dépendante de membranes cellulaires et éventuellement à la mort cellulaire associée à une déplétion métabolique et une perte d'intégrité mitochondriale (Bateman et al., 2000; Higuchi et al., 2000). Il a d'ailleurs été démontré que l'expression de la glycoprotéine d'enveloppe du VSV sur des cellules de mélanome murin pouvait permettre leur fusion à des cellules dendritiques et ainsi générer de puissants hybrides immunogéniques de courte vie (Phan et al., 2003). Différents mutants de VSV dans la protéine G ont également confirmé un potentiel d'induction de l'apoptose varié et une combinaison de ces mutations, avec ou sans la

mutation *M51R* de la protéine de la matrice, pourrait peut-être permettre une synergie des effets observés.

Les virus peuvent aussi être utilisés comme outils et manipulés afin d'induire la mort de cellules cibles plus efficacement. En y insérant des gènes d'intérêt, on peut les transformer en vecteurs dynamiques. Une perspective intéressante dans ce dessein pourrait être d'utiliser la protéine apoptine, provenant du virus de l'anémie infectieuse du poulet, pour augmenter l'activité oncolytique de certains virus. Une des caractéristiques remarquables de cette protéine est sa capacité à induire directement l'apoptose spécifiquement dans les cellules tumorales; les cellules primaires et non transformées y étant résistantes (Oorschot et al., 1997). Ce phénomène est dépendant de Bcl-2 et des caspases en plus d'engager Apaf1 et l'apoptosome dans l'induction de la mort induite par la mitochondrie (Burek et al., 2005). L'insertion de cette protéine dans un virus comme le VSV pourrait lui conférer des propriétés oncolytiques additionnelles très intéressantes.

Un virus en lice pour la virothérapie oncolytique

La lyse directe de même que l'induction de l'apoptose immunogénique de cellules tumorales *in vivo* semblent bien attirantes dans un but thérapeutique. C'est pourtant loin d'être la seule raison motivant l'utilisation du VSV dans un tel contexte. En effet, ce virus est un candidat très intéressant de par ses caractéristiques intrinsèques d'oncolyse. Il a été démontré que le VSV peut se répliquer préférentiellement dans les cellules ne répondant pas à l'IFN ou y étant résistantes, composant près de 80% des tumeurs humaines (Lichty et al., 2004; Stojdl et al., 2000a). Cependant, le VSV a aussi évolué de telle façon à pouvoir échapper à un contrôle antiviral cellulaire dans les tissus sains. En effet, le blocage de l'exportation nucléaire des ARNm d'interféron par la protéine M permet au virus de se répliquer dans tout type cellulaire. C'est pourquoi l'utilisation de mutants du virus, entre autres au niveau de la protéine de la matrice, permet une sélection de la réplication dans les lignées tumorales déficientes pour cette voie de signalisation antivirale (Balachandran and Barber, 2000, 2004; Desforges et al., 2001; Lichty et al., 2004; Stark et al., 1998).

Dans une optique de thérapie utilisant des virus oncolytiques, il devient évident qu'il sera impératif de développer des outils sécuritaires, efficaces et ciblés afin d'optimiser les

traitements de patients cancéreux. L'utilisation d'un virus dans un hôte affaibli par la maladie devra également être étroitement suivie. Des études menées par notre laboratoire ainsi que d'autres ont démontré que l'administration intratumorale de 1.5×10^9 particules de VSV, étant fortement contrôlées par les anticorps neutralisants, ne provoque aucun signe de toxicité chez la souris. Toujours dans le cas du VSV, la production d'IFN de même que la réponse immunitaire primaire par la stimulation de la voie de signalisation MyD88 via les Toll-Like Receptor-4 (TLR4) ou TLR7 jouent un rôle crucial dans le contrôle de l'infection par les cellules saines, limitant la réplication aux cellules tumorales (Ahmed et al., 2009; Georgel et al., 2007; Wongthida et al., 2010a).

Promouvoir l'implication du système immunitaire

La rémission soudaine d'une patiente atteinte de leucémie après avoir contracté l'influenza a fait naître le concept d'oncolyse virale dès le début du vingtième siècle (Dock, 1904). En effet, il a alors été établi que les cellules cancéreuses étant devenues déficientes dans les mécanismes de protection, de réparation cellulaire et d'apoptose, pouvaient devenir des cibles pour certains virus (Lemay, 2012). Ceux-ci auront souvent le potentiel d'infecter plusieurs types de cellules, mais l'infection ou la dissémination sera contrôlée dans les cellules saines tandis que les cellules tumorales soutiendront une réplication efficace. Il y aura par la suite lyse de ces cellules associée à la relâche de particules virales de même que différents antigènes tumoraux. Ce sont ces antigènes tumoraux dans un contexte pro-inflammatoire induit par l'infection qui pourront être reconnus et apprêtés par des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, comme les cellules dendritiques, afin d'induire une réponse spécifique des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) (Figure 5).

Dans ce scénario, le virus sert donc d'inducteur afin de provoquer la migration d'effecteurs immunitaires innés et adaptatifs au site tumoral. En effet, le microenvironnement tumoral se développe généralement de façon à contrer la reconnaissance immunitaire ou en induisant un état immunosuppresseur. L'infection préférentielle des cellules tumorales par un virus tel VSV permet de briser cet état de tolérance en favorisant une inflammation locale. Ceci permet donc le recrutement des différentes cellules immunitaires et l'activation spécifique de lymphocytes T infiltrant.

Cependant, un des enjeux majeur relié au contrôle rigoureux de la dissémination virale demeure le mode d'administration du traitement. Beaucoup d'études y vont d'infections intratumorales en modèles murins pour maximiser l'infection des cellules cibles, mais ceci ne sera pas toujours transposable à l'humain. Il faudra alors se pencher vers le développement d'administration systémique, ce qui peut engendrer l'élimination du virus par le système immunitaire avant même que celui-ci ne se rende au site d'intérêt. C'est pour ces raisons que plusieurs virus sont présentement étudiés, dont certains génétiquement modifiés pour permettre leur entrée dans des cellules tumorales bien précises ou encore pour tenter d'échapper momentanément à la reconnaissance immune.

Les percées en virothérapie oncolytique

Plusieurs avenues ont été proposées par différents chercheurs dans les dernières années afin de contourner les problématiques reliées à la virothérapie oncolytique. En outre, il a été proposé d'insérer dans le génome de divers virus des sites de liaison à des microARN précis (Kelly et al., 2010). De cette façon, les cellules saines produisant ces microARN seront en mesure de reconnaître l'ARN viral et de le détruire afin de limiter l'infection. Les cellules tumorales quant à elles, perdent souvent ces propriétés de régulation de l'ARN et donc ne peuvent contrôler efficacement l'infection.

D'autres équipes ont également trouvé des façons ingénieuses de cacher les particules virales au système immunitaire soit en les adsorbant directement sur des lymphocytes T (Qiao et al., 2008a) ou encore en les recouvrant de molécules inertes comme le polyéthylène glycol (Doronin et al., 2009). Ce processus serait très intéressant dans le cadre d'une thérapie par VSV puisque ce virus est très rapidement contrôlé par les anticorps neutralisants et vite reconnu par le complément ce qui empêche pour le moment une administration systémique efficace.

La combinaison de molécules comme des inhibiteurs d'histones déacétylases ou certains agents alkylants avec les virus peut aussi apporter plusieurs avantages. Tandis que le premier groupe peut influencer les modifications épigénétiques de la chromatine et affaiblir la réponse cellulaire antivirale (Génin et al., 2012), la cyclophosphamide appartenant au

deuxième groupe peut inhiber directement des lymphocytes T régulateurs ayant un effet plutôt suppresseur sur la réponse générée contre la tumeur (Fulci et al., 2006).

Il a aussi été démontré qu'il est possible de miser sur l'effet synergique de deux virus pour une même cible. En effet, la pré-infection par le virus de la vaccine a le potentiel de rendre sensible au VSV les cellules tumorales qui y étaient préalablement résistantes en bloquant leur cascade de réponse à l'interféron (Le Boeuf et al., 2010).

Plusieurs études cliniques utilisant des virus oncolytiques ont également été réalisées ou sont présentement en cours en Amérique du Nord ainsi qu'en Europe (Tableau I) (Breitbach et al., 2011; Fu and Zhang, 2002; Guo et al., 2008; Msaouel et al., 2009; Ries and Korn, 2002; Touchefeu et al., 2012). On compte de plus en plus de souches virales faisant l'objet d'études de phase II et III pour plusieurs types de tumeurs. Bien que variables, ces résultats semblent somme toute très prometteurs (Breitbach et al., 2011; Galanis et al., 2012).

Finalement, il ne faut pas passer sous silence une des plus grandes percées dans le domaine de la virothérapie oncolytique, soit l'acceptation par les autorités chinoises en 2005 du premier virus oncolytique, issu d'un adénovirus H101 génétiquement modifié, pour le traitement des cancers du cou et de la tête. Cette percée va assurément favoriser la reconnaissance d'une telle option dans les traitements futurs contre le cancer.

En conclusion

Les différentes recherches en virothérapie oncolytique permettront la compréhension des mécanismes de régression tumorale induits par les virus afin de permettre éventuellement aux patients cancéreux de considérer un traitement curatif alternatif. En maîtrisant ces mécanismes, nous serons donc plus à même de manipuler et d'amplifier une réponse antitumorale en vue d'une thérapie ciblée et efficace.

Conflit d'intérêts

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

Remerciements

Les auteurs remercient Simon Janelle pour ses illustrations schématiques du cycle de réplication virale de même que du principe de la virothérapie oncolytique (figures 1 et 5). Ils remercient également Jean-Jacques Perreault pour ses commentaires et suggestions sur le manuscrit. Alain Lamarre est titulaire de la Chaire de Recherche Jeanne et J.-Louis Lévesque en Immunovirologie de la Fondation J.-Louis Lévesque. Valérie Janelle est récipiendaire d'une bourse doctorale de la Fondation Armand-Frappier.

Références

- Ahmed, M., and Lyles, D.S. (1998). Effect of Vesicular Stomatitis Virus matrix protein on transcription directed by host RNA polymerases I, II, and III. *J. Virol.* 72, 8413-8419.
- Ahmed, M., McKenzie, M.O., Puckett, S., Hojnacki, M., Poliquin, L., and Lyles, D.S. (2003). Ability of the matrix protein of Vesicular Stomatitis Virus to suppress beta interferon gene expression is genetically correlated with the inhibition of host RNA and protein synthesis. *J. Virol.* 77, 4646-4657.
- Ahmed, M., Mitchell, L.M., Puckett, S., Brzoza-Lewis, K.L., Lyles, D.S., and Hiltbold, E.M. (2009). Vesicular stomatitis virus M protein mutant stimulates maturation of Toll-like receptor 7 (TLR7)-positive dendritic cells through TLR-dependent and -independent mechanisms. *J. Virol.* 83, 2962-2975.
- Albertini, A.A.V., Baquero, E., Ferlin, A., and Gaudin, Y. (2012). Molecular and cellular aspects of Rhabdovirus entry. *Viruses* 4, 117-139.
- Balachandran, S., and Barber, G.N. (2000). Vesicular stomatitis virus (VSV) therapy of tumors. *IUBMB Life* 50, 135-138.
- Balachandran, S., and Barber, G.N. (2004). Defective translational control facilitates vesicular stomatitis virus oncolysis. *Cancer Cell* 5, 51-65.
- Bateman, A., Bullough, F., Murphy, S., Emiliusen, L., Lavillette, D., Cosset, F.-L., Cattaneo, R., Russell, S.J., and Vile, R.G. (2000). Fusogenic membrane glycoproteins as a novel class of genes for the local and immune-mediated control of tumor growth. *Cancer Res.* 60, 1492-1497.
- Blondel, D., Harmison, G.G., and Schubert, M. (1990). Role of matrix protein in cytopathogenesis of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 64, 1716-1725.
- Breitbach, C.J., Burke, J., Jonker, D., Stephenson, J., Haas, A.R., Chow, L.Q.M., Nieva, J., Hwang, T.-H., Moon, A., Patt, R., *et al.* (2011). Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans. *Nature* 477, 99-102.
- Burek, M., Maddika, S., Burek, C.J., Daniel, P.T., Schulze-Osthoff, K., and Los, M. (2005). Apoptin-induced cell death is modulated by Bcl-2 family members and is Apaf-1 dependent. *Oncogene* 25, 2213-2222.

- Connor, J.H., and Lyles, D.S. (2002). Vesicular Stomatitis Virus infection alters the eIF4F translation initiation complex and causes dephosphorylation of the eIF4E binding protein 4E-BP1. *J. Virol.* *76*, 10177-10187.
- Cureton, D.K., Massol, R.H., Saffarian, S., Kirchhausen, T.L., and Whelan, S.P.J. (2009). Vesicular Stomatitis Virus enters cells through vesicles incompletely coated with clathrin that depend upon actin for internalization. *PLoS Pathog.* *5*, e1000394.
- Dancho, B., McKenzie, M.O., Connor, J.H., and Lyles, D.S. (2009). Vesicular stomatitis virus matrix protein mutations that affect association with host membranes and viral nucleocapsids. *The Journal of Biological Chemistry* *284*, 4500-4509.
- Desforges, M., Charron, J., Bérard, S., Beausoleil, S., Stojdl, D.F., Despars, G., Laverdière, B., Bell, J.C., Talbot, P.J., Stanners, C.P., and Poliquin, L. (2001). Different host-cell shutoff strategies related to the matrix protein lead to persistence of vesicular stomatitis virus mutants on fibroblast cells. *Virus Res.* *76*, 87-102.
- Desforges, M., Despars, G., Bérard, S., Gosselin, M., McKenzie, M.O., Lyles, D.S., Talbot, P.J., and Poliquin, L. (2002). Matrix protein mutations contribute to inefficient induction of apoptosis leading to persistent infection of human neural cells by Vesicular Stomatitis Virus. *Virology* *295*, 63-73.
- Dock, G. (1904). Influence of complicating diseases upon leukemia. *Am. J. Med. Sci.* *127*, 563-592.
- Doronin, K., Shashkova, E.V., May, S.M., Hofherr, S.E., and Barry, M.A. (2009). Chemical modification with high molecular weight polyethylene glycol reduces transduction of hepatocytes and increases efficacy of intravenously delivered oncolytic Adenovirus. *Hum. Gene Ther.* *20*, 975-988.
- Francoeur, A.M., Poliquin, L., and Stanners, C.P. (1987). The isolation of interferon-inducing mutants of vesicular stomatitis virus with altered viral P function for the inhibition of total protein synthesis. *Virology* *160*, 236-245.
- Fu, X., and Zhang, X. (2002). Potent systemic antitumor activity from an oncolytic Herpes Simplex Virus of syncytial phenotype. *Cancer Res.* *62*, 2306-2312.
- Fulci, G., Breymann, L., Gianni, D., Kurozumi, K., Rhee, S.S., Yu, J., Kaur, B., Louis, D.N., Weissleder, R., Caligiuri, M.A., and Chiocca, E.A. (2006). Cyclophosphamide

- enhances glioma virotherapy by inhibiting innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *103*, 12873-12878.
- Galanis, E., Markovic, S.N., Suman, V.J., Nuovo, G.J., Vile, R.G., Kottke, T.J., Nevala, W.K., Thompson, M.A., Lewis, J.E., Rumilla, K.M., *et al.* (2012). Phase II trial of intravenous administration of Reolysin[reg] (Reovirus serotype-3-dearing strain) in patients with metastatic melanoma. *Mol. Ther.* *20*, 1998-2003.
- Garcia-Sastre, A., and Biron, C.A. (2006). Type 1 interferons and the virus-host relationship: A lesson in detente. *Science* *312*, 879-882.
- Ge, P., Tsao, J., Schein, S., Green, T.J., Luo, M., and Zhou, Z.H. (2010). Cryo-EM Model of the Bullet-Shaped Vesicular Stomatitis Virus. *Science* *327*, 689-693.
- Génin, P., Lin, R., Hiscott, J., and Civas, A. (2012). Recruitment of Histone Deacetylase 3 to the Interferon-A Gene Promoters Attenuates Interferon Expression. *PLoS ONE* *7*, e38336.
- Georgel, P., Jiang, Z., Kunz, S., Janssen, E., Mols, J., Hoebe, K., Bahram, S., Oldstone, M.B.A., and Beutler, B. (2007). Vesicular stomatitis virus glycoprotein G activates a specific antiviral Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Virology* *362*, 304-313.
- Guo, Z.S., Thorne, S.H., and Bartlett, D.L. (2008). Oncolytic virotherapy: Molecular targets in tumor-selective replication and carrier cell-mediated delivery of oncolytic viruses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* *1785*, 217-231.
- Higuchi, H., Bronk, S.F., Bateman, A., Harrington, K., Vile, R.G., and Gores, G.J. (2000). Viral Fusogenic Membrane Glycoprotein Expression Causes Syncytia Formation with Bioenergetic Cell Death: Implications for Gene Therapy. *Cancer Res.* *60*, 6396-6402.
- Hoffmann, M., Wu, Y.-J., Gerber, M., Berger-Rentsch, M., Heimrich, B., Schwemmle, M., and Zimmer, G. (2010). Fusion-active glycoprotein G mediates the cytotoxicity of vesicular stomatitis virus M mutants lacking host shut-off activity. *J. Gen. Virol.* *91*, 2782-2793.
- Janelle, V., Brassard, F., Lapierre, P., Lamarre, A., and Poliquin, L. (2011). Mutations in the Glycoprotein of Vesicular Stomatitis Virus Affect Cytopathogenicity: Potential for Oncolytic Virotherapy. *J. Virol.* *85*, 6513-6520.
- Jayakar, H.R., Jeetendra, E., and Whitt, M.A. (2004). Rhabdovirus assembly and budding. *Virus Res.* *106*, 117-132.

- Kelly, E.J., Nace, R., Barber, G.N., and Russell, S.J. (2010). Attenuation of Vesicular Stomatitis Virus Encephalitis through MicroRNA Targeting. *J. Virol.* *84*, 1550-1562.
- Kopeky, S.A., Willingham, M.C., and Lyles, D.S. (2001). Matrix Protein and Another Viral Component Contribute to Induction of Apoptosis in Cells Infected with Vesicular Stomatitis Virus. *J. Virol.* *75* 12169-12181.
- Le Boeuf, F., Diallo, J.-S., McCart, J.A., Thorne, S., Falls, T., Stanford, M., Kanji, F., Auer, R., Brown, C.W., Lichty, B.D., *et al.* (2010). Synergistic Interaction Between Oncolytic Viruses Augments Tumor Killing. *Mol. Ther.* *18*, 888-895.
- Lemay, G. (2012). Apprivoiser nos ennemis pour en faire des alliés : la « virothérapie » anticancéreuse. *Med Sci (Paris)* *28*, 339-340.
- Letchworth, G.J., Rodriguez, L.L., and Del Cbarrera, J. (1999). Vesicular Stomatitis. *The Veterinary Journal* *157*, 239-260.
- Libersou, S., Albertini, A.A.V., Ouldali, M., Maury, V., Maheu, C., Raux, H., de Haas, F., Roche, S., Gaudin, Y., and Lepault, J. (2010). Distinct structural rearrangements of the VSV glycoprotein drive membrane fusion. *The Journal of Cell Biology* *191*, 199-210.
- Lichty, B.D., Power, A.T., Stojdl, D.F., and Bell, J.C. (2004). Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. *TRENDS in Molecular Medecine* *10*, 211-217.
- Lyles, D.S., McKenzie, M.O., Kaptur, P.E., Grant, K.W., and Jerome, W.G. (1996). Complementation of M Gene Mutants of Vesicular Stomatitis Virus by Plasmid-Derived M Protein Converts Spherical Extracellular Particles into Native Bullet Shapes. *Virology* *217*, 76-87.
- McCreeley, B.J.J., and Lyles, D.S. (1989). Distribution of M protein and nucleocapsid protein of vesicular stomatitis virus in infected cell plasma membranes. *Virus Res.* *14*, 189-205.
- Melki, R., Gaudin, Y., and Blondel, D. (1994). Interaction between Tubulin and the Viral Matrix Protein of Vesicular Stomatitis Virus: Possible Implications in the Viral Cytopathic Effect. *Virology* *202*, 339-347.
- Msaouel, P., Dispenzieri, A., and Galanis, E. (2009). Clinical testing of engineered oncolytic measles virus strains in the treatment of cancer: an overview. *Curr. Opin. Mol. Ther.* *11*, 43-53.

- Oorschot, A.A.A.M.D.-V., Fischer, D.F., Grimbergen, J.M., Klein, B., Zhuang, S.-M., Falkenburg, J.H.F., Backendorf, C., Quax, P.H.A., Van der Eb, A.J., and Noteborn, M.H.M. (1997). Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *94*, 5843-5847.
- Petersen, J.M., Her, L.S., Varvel, V., Lund, E., and Dahlberg, J.E. (2000). The matrix protein of vesicular stomatitis virus inhibits nucleocytoplasmic transport when it is in the nucleus and associated with nuclear pore complexes. *Molecular Cell Biology* *20*, 8590-8601.
- Phan, V., Errington, F., Cheong, S.C., Kottke, T., Gough, M., Altmann, S., Brandenburger, A., Emery, S., Strome, S., Bateman, A., *et al.* (2003). A new genetic method to generate and isolate small, short-lived but highly potent dendritic cell-tumor cell hybrid vaccines. *Nat. Med.* *9*, 1215-1219.
- Qiao, J., Kottke, T., Willmon, C., Galivo, F., Wongthida, P., Diaz, R.M., Thompson, J., Ryno, P., Barber, G.N., Chester, J., *et al.* (2008). Purging metastases in lymphoid organs using a combination of antigen-nonspecific adoptive T cell therapy, oncolytic virotherapy and immunotherapy. *Nat. Med.* *14*, 37-44.
- Ries, S., and Korn, W.M. (2002). ONYX-015: mechanisms of action and clinical potential of a replication-selective adenovirus. *Br. J. Cancer* *86*, 5-11.
- Roche, S., Rey, F.A., Gaudin, Y., and Bressanelli, S. (2007). Structure of the Prefusion Form of the Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G. *Science* *315*, 843-848.
- Rose, J.K., and Whitt, M.A. (2001). Rhabdoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe D.M., Howley P.M. (eds). *Fields Virology*, 4th edn (Philadelphia).
- Stark, G.R., Kerr, I.M., and Williams, B.R. (1998). How cells respond to interferons. p. 227.
- Stojdl, D.F., Lichty, B., Knowles, S., Marius, R., Atkins, H., Sonenberg, N., and Bell, J.C. (2000). Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat. Med.* *6*, 821-825.
- Stojdl, D.F., Lichty, B.D., tenOever, B.R., Paterson, J.M., Power, A.T., Knowles, S., Marius, R., Reynard, J., Poliquin, L., Atkins, H., *et al.* (2003). VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* *4*, 263-275

- Touchefeu, Y., Schick, U., and Harrington, K.J. (2012). Le virus de la rougeole. *Med Sci (Paris)* 28, 388-394.
- Wollmann, G., Rogulin, V., Simon, I., Rose, J.K., and van den Pol, A.N. (2010). Some Attenuated Variants of Vesicular Stomatitis Virus Show Enhanced Oncolytic Activity against Human Glioblastoma Cells relative to Normal Brain Cells. *J. Virol.* 84, 1563-1573.
- Wongthida, P., Diaz, R.M., Galivo, F., Kottke, T., Thompson, J., Melcher, A., and Vile, R. (2010). VSV Oncolytic Virotherapy in the B16 Model Depends Upon Intact MyD88 Signaling. *Mol. Ther.*
- Zhang, X., Green, T.J., Tsao, J., Qiu, S., and Luo, M. (2008). Role of Intermolecular Interactions of Vesicular Stomatitis Virus Nucleoprotein in RNA Encapsidation. *J. Virol.* 82, 674-682.

Virus Exemple de souche étudiée	Gène viral déficient	Cible cellulaire privilegiée du virus	Modèle tumoral	Étude clinique	Limite
Adénovirus Onyx-015 H101	<i>E1B</i>	Voie p53 défectueuse	Cerveau, larynx, foie, ovaire, thyroïde	Phase III (Onyx-015) Accepté en Chine (H101)	Élimination hépatique, anticorps neutralisants
Virus de l'herpès simplex G207	Délétion du gène <i>lcp34.5</i> Inactivation du gène <i>lcp6</i>	Protéine phosphatase 1a, et défaut de la cascade IFN	Cerveau, sein, côlon, poumon, ovaire, prostate	Phase I/II	Virus atténué par les mutations
Réovirus Reolysin	Souche sauvage ou mutée dans la protéine S1	Voie Ras constitativement activée	Cerveau, sein, côlon, ovaire	Phase III	Possible immunité préexistante contre les réovirus
Virus de la stomatite vésiculaire	Souche sauvage ou mutée dans les protéines M ou G	Défaut de la cascade IFN	Côlon, poumon, peau	-	Anticorps neutralisants
Virus de la rougeole MV-NIS	Expression du symporteur sodium/ iodure	Se lie au récepteur CD46 souvent surexprimé dans les tumeurs	Cerveau, ovaires, os	Phase I/II	Immunité contre le virus chez les sujets vaccinés
Virus de la vaccine JX-594	Inactivation du gène codant pour la thymidine kinase et expression du gène codant pour le GM-CSF	Voie EGFR/ Ras activée, augmentation de la thymidine kinase cellulaire et résistance à l'IFN	Foie, poumon, peau, côlon	Phase I/II	Anticorps neutralisants induits après plusieurs traitements

Tableau I. Exemples de virus oncolytiques réplicatifs et leur applications thérapeutiques.

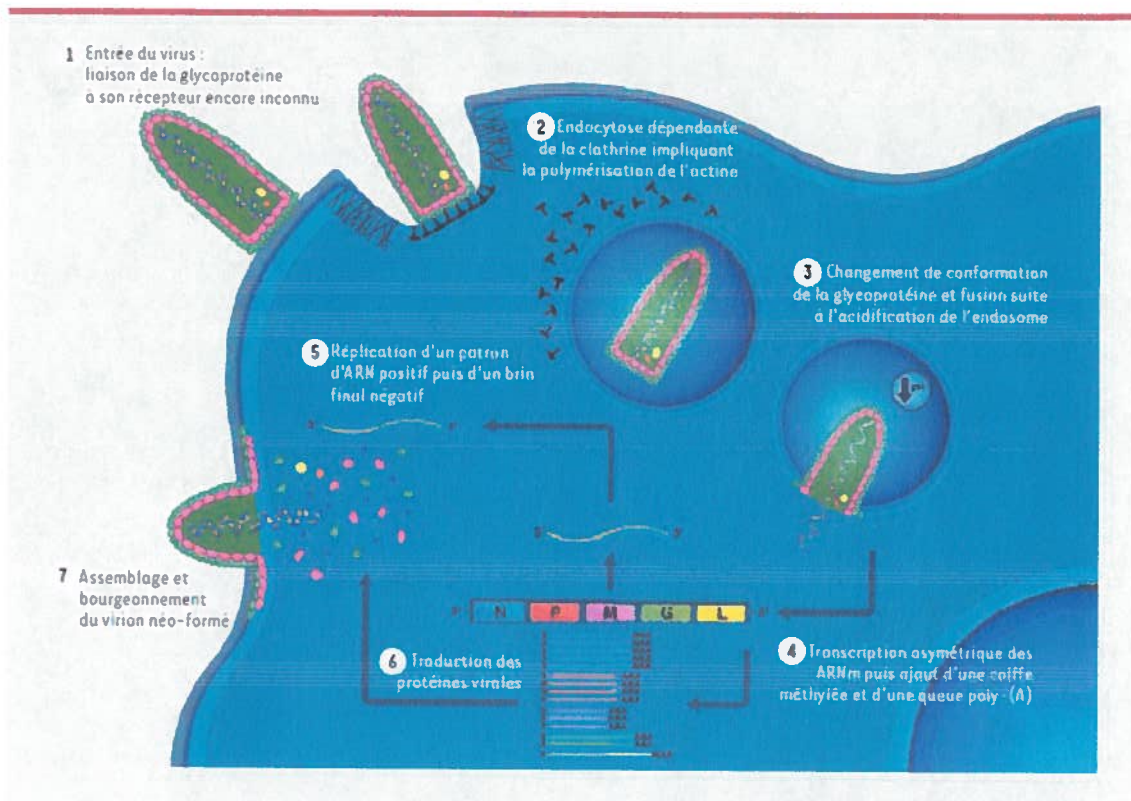


Figure 1. Cycle de réplication du VSV. Le VSV se lie via sa base aux cellules cibles par un trimère de glycoprotéine sur son récepteur encore inconnu. L'entrée se fait par endocytose dépendante de la clathrine et aidée par la polymérisation de l'actine. Suite à l'acidification de l'endosome, un changement de conformation de la protéine G permet la fusion menant au relargage du matériel génétique du virus dans le cytoplasme de la cellule infectée. La transcription et la réplication sont assurées par la polymérase virale associée avec une combinaison de phosphoprotéine et/ou de protéine de nucléocapside. Les protéines N liées au nouveau brin d'ARN de polarité négative seront amenées à la membrane et le bourgeonnement de la particule, induite par la glycoprotéine aidée de la protéine de la matrice, pourra générer de nouveaux virions répliatifs.

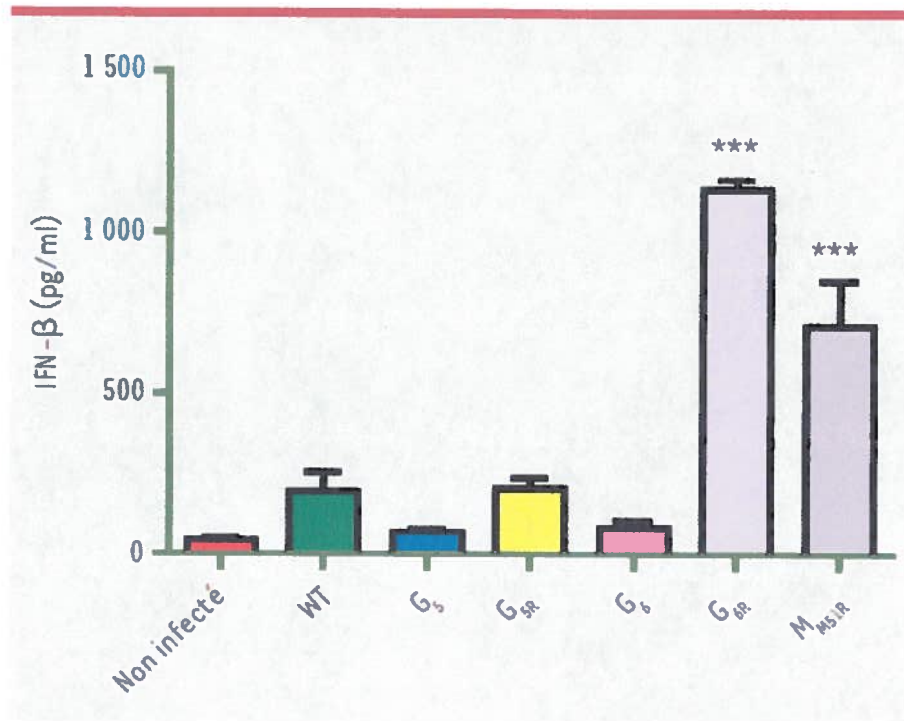


Figure 2. Interféron- β induit par différents mutants du VSV. Comparaison de l'induction d'interféron- β après 24 heures d'infection à faible multiplicité d'infection (MOI 0.1) avec les souches sauvage (WT) et mutantes du VSV dans la protéine de la matrice (M_{MS1R}) et dans la glycoprotéine d'enveloppe (G₅, G_{5R}, G₆, G_{6R}).

*** signifie $p < 0,001$ par rapport au contrôle non infecté.

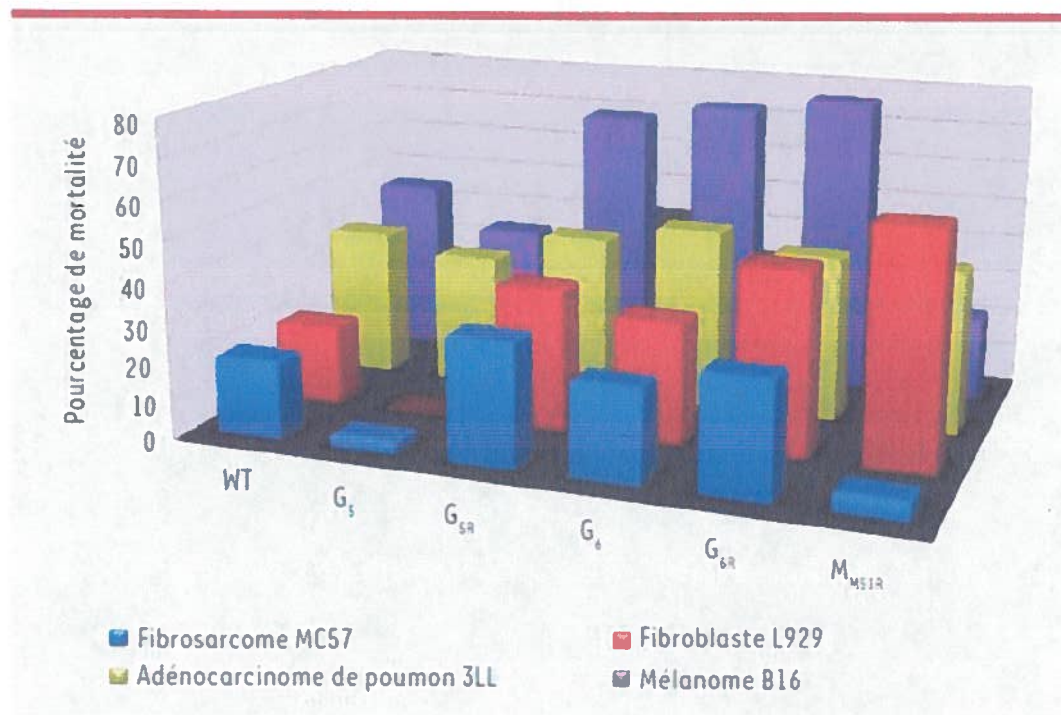


Figure 3. Pourcentage de mortalité induit par différents mutants du VSV sur diverses lignées cellulaires. Comparaison de l'induction de la mort cellulaire après 36 heures d'infection à forte multiplicité d'infection (MOI 20) avec les souches sauvage (WT) et mutantes du VSV dans la protéine de la matrice (M_{M51R}) et dans la glycoprotéine d'enveloppe (G₅, G_{5R}, G₆, G_{6R}) sur une lignée cellulaire murine non transformée (L929) et trois lignées tumorales (3LL, MC57, B16).

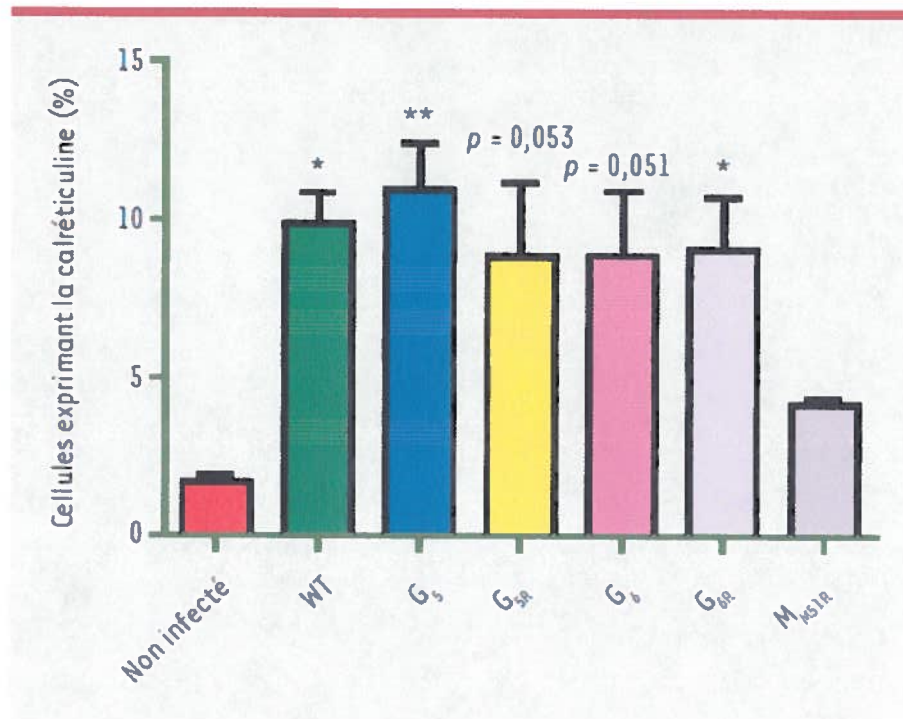


Figure 4. Expression de la calréticuline suite à l'infection par différents mutants du VSV. Comparaison de l'induction de l'expression de la calréticuline à la surface cellulaire après 12 heures d'infection à forte multiplicité d'infection (MOI 20) avec les souches sauvage (WT) et mutantes du VSV dans la protéine de la matrice (M_{MS1R}) et dans la glycoprotéine d'enveloppe (G₅, G_{5R}, G₆, G_{6R}).

* signifie $p < 0,05$ et ** signifie $p < 0,01$ par rapport au contrôle non infecté.

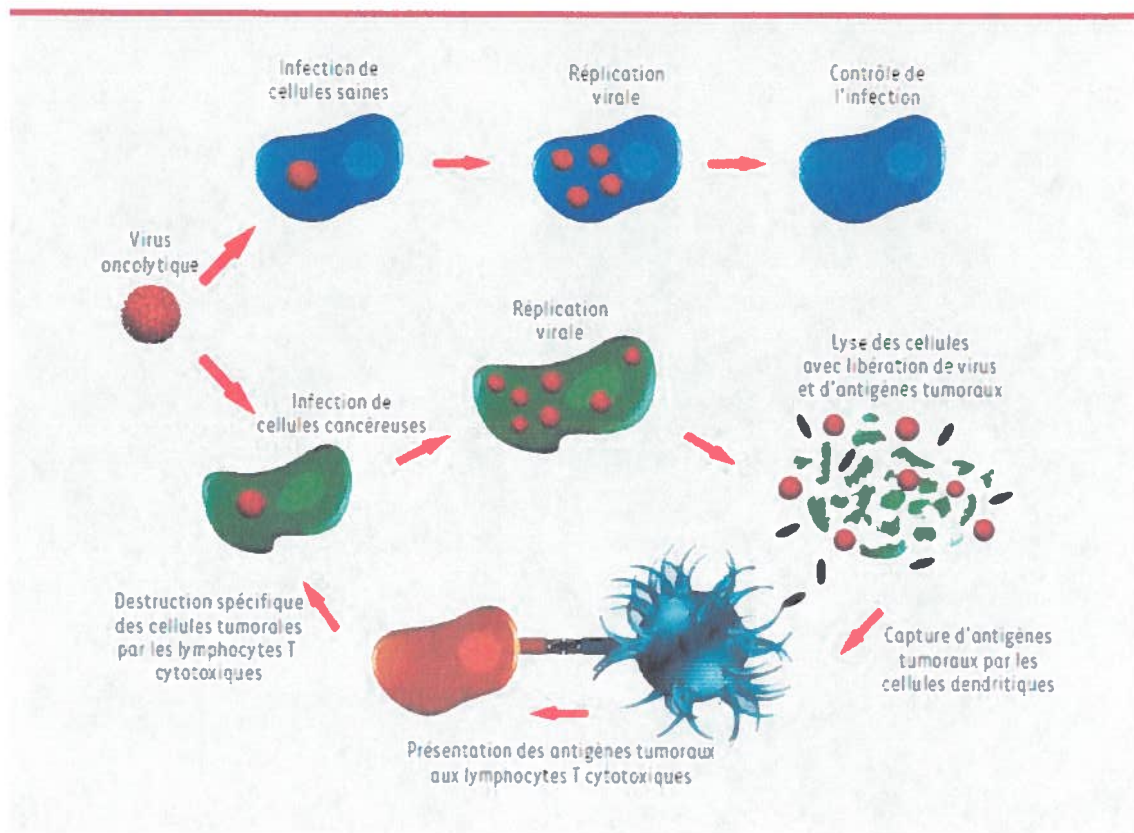


Figure 5. Principe de la virothérapie oncolytique. Un virus oncolytique comme le VSV peut infecter une grande variété de types cellulaires. Cependant, des mécanismes de protection antiviraux permettront aux cellules saines de limiter la réplication ou la dissémination du virus. À l’opposé, les cellules tumorales sont généralement devenues déficientes dans ces mécanismes de protection et sont donc susceptibles à la réplication virale. Lorsqu’il y a lyse des cellules cancéreuses suite à l’infection, des antigènes tumoraux sont relâchés dans le milieu extracellulaire et un microenvironnement pro-inflammatoire est créé. Le système immunitaire adaptatif est alors sollicité et les antigènes tumoraux peuvent être présentés par des cellules dendritiques afin de monter une réponse immunitaire contre la tumeur.

4. Hypothèse et objectifs

Étant donné que les tumeurs solides deviennent cliniquement identifiables lorsqu'elles ont acquis l'habileté de contrecarrer leur reconnaissance ou leur élimination par le système immunitaire, il est très difficile de trouver un traitement efficace pour renverser cet état. L'utilisation de virus à des fins thérapeutiques se veut un moyen d'induire un état pro-inflammatoire au site tumoral et ainsi engendrer une lyse des cellules cancéreuses dans un milieu contenant déjà des signaux pouvant alerter le système immunitaire. De cette façon, des antigènes tumoraux pourront être internalisés puis apprêtés par des cellules présentatrices d'antigènes activées par le microenvironnement inflammatoire et ainsi briser la tolérance qui s'était établie face aux cellules cancéreuses.

Plusieurs études ont d'ailleurs démontré que l'infection intratumorale permet la réplication virale principalement à l'interface du cœur nécrotique et des cellules cancéreuses viables en division. Ceci a mené à l'élaboration du concept d'équilibre dynamique entre les cellules tumorales vivantes et mourantes (Grote et al., 2001; Peng et al., 2002). D'après ce modèle, les cinétiques respectives de la réplication du virus et de la division des cellules tumorales détermineront le sort du traitement. De façon simplifiée, les tumeurs ayant une croissance égale ou supérieure à celles du virus thérapeutique ne seront pas éradiquées, mais démontreront plutôt une recrudescence de croissance une fois le virus éliminé. Dans ce cas, le système immunitaire limitera le potentiel thérapeutique, à moins qu'une immunité antitumorale ait été générée pour prendre le relai.

Nous croyons donc qu'il est impératif de bien caractériser les différentes étapes de la génération d'une réponse immunitaire dirigée contre le mélanome afin de comprendre par la suite comment influencer cette réponse pour la rendre plus efficace. De plus, nous avons posé l'hypothèse que les informations recueillies nous permettront alors de potentialiser le système immunitaire grâce à l'utilisation de virus oncolytiques ou en jouant directement sur des effecteurs de l'immunité. Trois objectifs principaux ont été élaborés dans ce but:

- 1) Évaluer le potentiel oncolytique *in vitro* de différents mutants du VSV afin de déterminer si des mutations spécifiques peuvent augmenter cet effet.
- 2) Déterminer l'efficacité du traitement oncolytique par VSV en modèle murin et vérifier quel est son effet sur les différentes étapes de la génération d'une réponse immunitaire antitumorale.
- 3) Analyser comment le système du complément peut nous permettre de potentialiser la réponse immunitaire contre la tumeur.

RÉSULTATS

1. Caractérisation du potentiel oncolytique *in vitro* de mutants du virus de la stomatite vésiculaire.

Le virus de la stomatite vésiculaire est un prototype intensivement étudié ayant un potentiel oncolytique intrinsèque. En effet, la souche sauvage du sérotype Indiana, appelé HR (heat resistant) permet l'induction d'effets cytopathiques rapides. L'étude de mutants thermosensibles, principalement au niveau de la protéine de la matrice (M), permet la réplication du virus dans les cellules déficientes au niveau de la cascade de l'interféron, phénotype fréquent chez les cellules cancéreuses (Lichty et al., 2004). Cependant, les mutants de M sont atténués en comparaison à la souche parentale, ont un tropisme neurologique *in vivo* et peuvent persister dans des cellules en culture (Desforges et al., 2001; Desforges et al., 2002; Stanners and Goldberg, 1975). Afin de découvrir d'autres mutants du VSV, une équipe a isolé des variants ayant un phénotype de dissémination modifiée en présence d'interféron de type I. Ces souches étaient alors considérées comme inductrices de la cytokine (Francoeur et al., 1980). Des analyses subséquentes ont démontré que ces mutants du VSV, alors appelés TP5, TP5R1, TP6 et TP6R1 pouvaient inhiber la synthèse protéique des cellules infectées plus efficacement que la souche HR et n'étaient donc pas atténués comme le mutant de M T1026 (Francoeur et al., 1987).

C'est à partir de ces informations que nous avons voulu étudier de façon plus approfondie les mutants TP5, TP5R1, TP6 et TP6R1 afin de déterminer leur potentiel en vue d'une virothérapie oncolytique. Cet article décrit donc les mutations retrouvées sur ces variants viraux, l'effet de ces dernières sur leur réplication de même que leur habileté à induire des effets cytopathiques en culture cellulaire. De plus, ces mutants ont été testés sur différents types de cellules tumorales murines et humaines pour vérifier leur potentiel oncolytique. Nous démontrons donc que certaines associations virus-cellules tumorales sont plus avantageuses dans une optique d'élaboration d'un traitement oncolytique.

1.1 Article 2. « Mutations in the glycoprotein of vesicular stomatitis virus affect cytopathogenicity : Potential for oncolytic virotherapy » (*J Virol.* 2011; 85 : 6513-20).

Contribution des différents auteurs

VJ : Conception de l'étude, expérimentations (sauf tableau 1 et figure supplémentaire 1) et rédaction de l'article

FB : Expérimentations : séquençage des mutations virales (Tableau 1)

PL : Expérimentations : analyse structurale (Figure supplémentaire 1)

AL : Supervision et rédaction de l'article

LP : Supervision et rédaction de l'article

**MUTATIONS IN THE GLYCOPROTEIN OF VESICULAR STOMATITIS VIRUS
AFFECT CYTOPATHOGENICITY : POTENTIAL FOR ONCOLYTIC
VIROTHERAPY.**

Valérie Janelle^{1,2}, Frédérick Brassard², Pascal Lapierre¹, Alain Lamarre^{1,2,†,*}, Laurent
Poliquin^{2,†,*}

Affiliations : ¹ Immunovirology laboratory, Institut national de la recherche scientifique,
INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada

² Biomed Research Center, Department of Biology, Université du Québec à
Montréal, Montréal, Québec, Canada

Correspondance to : A. Lamarre, Immunovirology Laboratory,
Institut national de la recherche scientifique,
INRS-Institut Armand-Frappier,
Laval, Québec, Canada, H7V 1B7
Phone : 450-687-5010 ext. 4262
Fax : 450-686-5501
E-mail : alain.lamarre@iaf.inrs.ca

L. Poliquin, Biomed Research Center,
Department of biology,
Université du Québec à Montréal,
P.O. Box 8888, Station Centreville,
Montréal, Québec, Canada H3C 3P8
Phone : 514-987-3000 ext. 6192
Fax : 514-987-4647
E-mail : poliquin.laurent@uqam.ca

† A. L. and L. P. contributed equally to this study.

Running title : Cytopathogenicity of VSV G protein mutants.

ABSTRACT

Vesicular stomatitis virus (VSV) has been widely used to characterize cellular processes, viral resistance and cytopathogenicity. Recently, VSV has also been used for oncolytic virotherapy due to its capacity to selectively lyse tumor cells. Mutants of the matrix (M) protein of VSV have generally been preferred to the wild-type virus for oncolysis because of their ability to induce type-I interferon despite causing weaker cytopathic effects. However, due to the large variability of tumor types, it is quite clear that various approaches and combinations of multiple oncolytic viruses will be needed to effectively treat most cancers. With this in mind, our work focused on characterizing the cytopathogenic profiles of four replicative envelope glycoprotein (G) VSV mutants. In contrast to the prototypic M mutant, VSV G mutants are as efficient as wild-type virus at inhibiting cellular transcription and host protein translation. Despite being highly cytopathic, mutant G_{6R} triggers type-I interferon secretion as efficiently as the M mutant. Importantly, most VSV G mutants are particularly more effective at killing B16 and MC57 tumor cells *in vitro* than the M mutant or wild-type virus through apoptosis induction. Taken together, our results demonstrate that VSV G mutants retain the high cytopathogenicity of wild-type VSV with G_{6R} inducing type-I IFN secretion at levels similar to that of the M mutant. VSV G protein mutants could therefore prove to be highly valuable for the development of novel oncolytic virotherapy strategies that are both safe and efficient for the treatment of various types of cancer.

INTRODUCTION

Vesicular stomatitis virus (VSV) is an extensively studied virus for a large number of applications. Member of the *Rhabdoviridae* family, VSV is an enveloped virus containing a 11,161 kb single strand RNA genome of negative polarity encoding five proteins: a nucleocapsid (N), a phosphoprotein (P), a matrix (M) protein, an envelope glycoprotein (G) and a polymerase (L) (Lichty et al., 2004; Rose and Whitt, 2001; Wagner and Hewlett, 2004). VSV is non endemic to North America and infection in humans is generally asymptomatic or may induce mild flu-like symptoms (Letchworth et al., 1999; Rose and Whitt, 2001).

VSV M protein is the smallest but the most abundant protein with around 1800 molecules per virion (McCreehy and Lyles, 1989). Considered the key protein for assembly and budding, M is mainly found in the cytoplasm (80 %) and sometimes linked to the plasma membrane (10-20%) (Ye et al., 1994). The M protein can also be found in the nucleus (Lyles et al., 1988) where it can inhibit transcription by interacting with the RNA polymerase II TFIID complex (Ahmed and Lyles, 1998; Black et al., 1993; Ferran and Lucas-Lenard, 1997; Flood et al., 2000) and with NUP98 resulting in an inhibition of the nucleocytoplasmic transport of host mRNAs (Glodowski et al., 2002; Petersen et al., 2000). It also inhibits cellular translation (Francoeur et al., 1987) by modifying the initiation complex eIF4F through dephosphorylation of initiation factors eIF4E and 4e-BP1 (Connor and Lyles, 2002; Francoeur et al., 1987). Finally, it was also shown to participate in apoptosis induction (Desforges et al., 2002; Kopecky and Lyles, 2003a; Kopecky and Lyles, 2003b; Kopecky et al., 2001).

Trimeric VSV G is responsible for attachment to the cellular receptor and for fusion to the cell membrane. Binding to the still controversial cellular receptor induces clathrin-mediated endocytosis (Le Blanc et al., 2005; Sun et al., 2005). As the pH drops in early endosomes, G changes conformation to allow fusion between the viral envelope and the endosomal membrane (Roche et al., 2007). The pH at which G is exposed during infection will determine three different structures: the pre-fusion state occurring at pH 7,

the active hydrophobic state optimal at pH 6 that initiates fusion and the post-fusion state (Roche et al., 2006; Roche et al., 2007). Interactions between G and M proteins have also been shown to increase budding efficiency (Swintek and Lyles, 2008). Apart from roles in fusion and particle assembly, G has recently been shown to also participate in cytotoxicity (Hoffmann et al., 2010) and in certain conditions, oncolysis (Wollmann et al., 2010).

VSV carrying mutant M proteins have been extensively studied (Lichty et al., 2004). When mutated at methionine 51, the M protein fails to block host gene expression thereby allowing the cell to secrete type-I interferons (IFN) (Garcia-Sastre and Biron, 2006; Stojdl et al., 2003). Consequently, VSV harboring an M protein containing the M51R mutation is not able to efficiently spread in normal tissue whereas cancer cells, often deficient in their ability to mount an effective antiviral response due to deficiencies in the IFN pathway, are readily infected (Balachandran and Barber, 2000, 2004; Stojdl et al., 2000a). This confers VSV its exquisite oncolytic properties (Balachandran and Barber, 2000, 2004; Desforges et al., 2001; Lichty et al., 2004; Stark et al., 1998).

In the last decade, multiple viruses have been tested as oncolytic agents with some of these already in clinical trials. One conclusion emerging from these studies is the need for developing a variety of different oncolytic agents if the successful treatment of a wide spectrum of cancer types is to be achieved. Moreover, the development of agents with diverse oncolytic characteristics could contribute to increase our knowledge of the mechanisms involved in virus-mediated tumor regression as well as providing new tools for the treatment of specific tumor types.

In light of this, we characterized the cytopathic profiles of four VSV G mutants. G₅, G₆, G_{5R} and G_{6R} were previously shown to possess a wild-type M protein (Desforges et al., 2001) while still being able to inhibit cellular protein translation (Francoeur et al., 1987) without persisting in infected cells (Desforges et al., 2002). These properties render them attractive candidates for oncolytic virotherapy studies. We therefore investigated the cytopathic properties of these G mutants by analyzing their capacity to inhibit host

cell transcription and protein synthesis. We also defined their ability to induce cell death in several tumor lines and their capacity to trigger type-I IFN secretion in murine fibroblasts. Finally, we demonstrated that, as for other VSV variants, virus-induced cell death closely correlates with induction of apoptosis.

MATERIAL AND METHODS

Cells and Viruses

L929 mouse fibroblasts were obtained from the American Type Culture Collection and grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). B16 melanoma, 3LL carcinoma and MC57 fibrosarcoma cells were obtained from Dr. A. Ochsenbein (Bern, Switzerland) and also grown in DMEM supplemented with 10% FBS. The origin of VSV G mutants studied here was described previously (Francoeur et al., 1987). G_5 , G_{5R} , G_6 , G_{6R} are referred respectively as TP5, TP5R1, TP6 and TP6R1 in other studies (Desforges et al., 2001; Francoeur et al., 1987). G_5 and G_6 were isolated from non-mutagenized VSV HR stocks, and thus share the same background. G_{5R} and G_{6R} are thermo-revertants of G_5 and G_6 respectively (see Results section for more detailed information). HR (designated here as WT) is a heat-resistant variant of the San Juan isolate of the Indiana serotype. The M_{M51R} mutant, originally named T1026 (Francoeur et al., 1987) or AV1 in more recent publications (Stojdl et al., 2003), is derived from mutagenized HR stocks and harbors the M51R mutation in the M protein. All viruses were propagated and titrated on Vero cells.

Viral genome sequencing and analysis

Vero cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 10. Total RNA was isolated with the E.Z.N.A extraction kit (Total RNA Kit; OMEGA BIO-TEK, Norcross, GA) according to the manufacturer's instructions. A cDNA copy of the viral RNA was first obtained by reverse transcription using an oligonucleotide primer complementary to the very 3' end of the genome. The cDNA copy was then submitted to PCR with 5 different pairs of primers, yielding 5 overlapping PCR products that covered the entire genome. Primers were derived from the VSV San Juan genome sequence (GI 9627229) and amplifications were done using the Fidelitaq™ DNA polymerase (USB Corporation, Santa Clara, CA). After size verification and purification on agarose gels, amplicons were sequenced by Génome Québec (Montréal, QC) with the Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer using the Dye Terminator technique (Applied Biosystems, Streetsville, ON). DNA sequences of the glycoprotein of mutants G_5 , G_{5R} , G_6 , G_{6R} were deposited in

Genbank under accession numbers HQ588113, HQ588114, HQ588115 and HQ588116 respectively. Sequence alignments of G mutants with the HR parental strain (GenBank accession no. HQ588112), San Juan wild-type (GenBank accession no. M35219) and M_{MS1R} mutant (GenBank accession no. HQ593628) were performed using CLUSTALW2 (Larkin et al., 2007). To identify mutations associated with the heat-resistant phenotype in our mutants, a modified *in silico* quantitative trait locus analysis was performed (Grupe et al., 2001). A correlation between differences in phenotype (ΔP) and genotype (ΔG) was established. A matrix of phenotypic similarity was created for mutants G_5 , G_{5R} , G_6 , G_{6R} , M_{MS1R} , parental HR and wild-type San Juan (values ranged from 0 to 1) and was defined as ΔP (phenotypic differences). For every amino acid position, a matrix of amino acid sequence differences between every mutant was created and defined as ΔG (genetic differences). A Pearson's correlation coefficient was then calculated for every ΔG and ΔP value. This raw correlation coefficient (R), ranging from -1 to 1, indicates either a perfect or inverse correlation between a mutation and the observed phenotype. To obtain a scaled value, the mean coefficient of correlation was subtracted from every coefficient of correlation and this difference was divided by the standard deviation (SD) of all coefficients of correlation. The scaled R value obtained defines the number of SD above or below the mean R value.

Structural analysis

Homology-based structural modeling of mutants was based on the crystal structure of VSV glycoprotein G (PDB ID 2J6J) in its prefusion form (Roche et al., 2007) which shares between 97.5 and 98.5% sequence homology with mutants (Bordoli et al., 2008). Structures of generated models were regularized by steepest descent energy minimization using the GROMOS96 force field (Schuler et al., 2001). Structural comparisons of proteins were performed using the SSM algorithm (Krissinel and Henrick, 2004). Figures were prepared using the PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3 (Schrödinger, LLC, Germany).

Viral replication

L929 cells were infected at an MOI of 0.1 or 20 in DMEM containing 2% FBS. Forty-five minutes post-infection, medium was removed and cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and fresh DMEM 2% FBS was added. At each time-point, supernatants were harvested and titers were determined by plaque assay on Vero cells as described previously (Desforages et al., 2001).

Analysis of viral mRNA synthesis

L929 cells were infected at an MOI of 20 or mock-infected. Forty-five minutes was allowed for adsorption of viral particles and DMEM containing 2% FBS was added. Parallel samples were incubated in the presence of actinomycin D (5 μ g/ml). At 2, 4, 6 and 8h post-infection, cells were labeled with 10 μ Ci/ml of 3 H-uridine (Uridine [5,6- 3 H], Perkin Elmer, Woodbridge, ON) for 30 minutes and harvested. Samples were then precipitated with 10% trichloroacetic acid on ice and washed twice with 5% trichloroacetic acid. Acid-precipitable radioactivity was measured by scintillation counting subtracting counts per minutes (CPM) of viral transcription (in presence of actinomycin D) from CPM of total transcription. Results of host cell transcription are presented as percentages of mock-infected cells.

Analysis of viral protein production

L929 cells were infected at an MOI of 20 or mock-infected as described above. At 4, 8, and 12h post-infection, cells were washed with PBS and pulsed 20 minutes with 50 μ Ci/ml of 35 S-labeled methionine-cysteine (EXPRES 35 S Protein Labeling Mix, Perkin Elmer, Woodbridge, ON) in Met-Cys-deficient medium (Invitrogen, Burlington, ON) supplemented with 2% FBS. Cells were then rinsed with PBS, harvested and lysed into radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (0.15M NaCl, 1% deoxycholic acid, 1% Triton, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1% SDS). Lysates were boiled and 30 μ g of labeled proteins were separated by migration on a 12% SDS-polyacrylamide gel. The gel was incubated 15 minutes in 15% glycerol and 30 minutes in 5-times gel volume Enhancer solution (Perkin Elmer, Woodbridge, ON), dried, transposed on a Kodak film overnight at -80°C and analyzed using the AlphaImager 3400 software. For total protein synthesis

determination, samples were precipitated with 10% trichloroacetic acid on ice and washed twice with 5% trichloroacetic acid. Acid-precipitable radioactivity was measured by scintillation counting.

Interferon induction

IFN- β quantification was performed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's instructions (Mouse IFN-Beta ELISA, PBL Biomedical Laboratories, New Brunswick, NJ) on supernatants from L929 cells infected with an MOI of 0.1 or 20 collected at 6, 12, 24 or 36h post-infection as described above.

Oncolysis

Mouse Lewis Lung 3LL carcinoma, mouse B16 melanoma, mouse EL4 lymphoma, human Jurkat T cell lymphoma, human HepG2 hepatocarcinoma, mouse MC57 fibrosarcoma, and mouse L929 fibroblasts were infected at an MOI of 20 or mock-infected as described above. Cell viability was measured by mitochondrial activity determination at 6, 12, 24, 36, 48 and 60h post-infection using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay (Cell Proliferation Kit I MTT, Roche Diagnostics, Mississauga, ON). Briefly, in 96-well plates, 10 μ l/well of MTT was added at each time point and cells were incubated for 1 hour at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. Then, 100 μ l/well of solubilization solution was added and formazan production was detected after an overnight incubation at 37°C by spectrophotometric analysis at 570 nm.

Apoptosis induction

L929 and B16 cells were infected at an MOI of 20 or mock-infected as described above. At 6, 12, 18 and 24h post-infection, CaspGLOW reagent (BioVision, Mountain View, CA) was added and cells were then washed with PBS and harvested. After 5 minutes of centrifugation at 800g, cells were resuspended in 500 μ l of the provided washing buffer. Cells were centrifuged again and fixed in washing buffer containing 2%

paraformaldehyde. Finally, cells were kept at 4°C until they were analyzed by flow cytometry using a FACSCalibur instrument (BD Biosciences) and the FlowJo software.

Statistical analysis

An ANOVA with Tukey test, using the SPSS software, was used to determine the statistical significance of data wherever indicated, and *P* values of less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Sequence analysis of VSV G mutants.

In order to characterize the potential of VSV G protein mutants as novel oncolytic agents, we took advantage of previously isolated mutants derived from the HR variant of the San Juan isolate of VSV (Indiana serotype) (Francoeur et al., 1987). Mutants, G₅, G_{5R}, G₆ and G_{6R} were isolated, without prior mutagenesis, by virtue of their small plaque-size phenotype on interferon (IFN)-inducible cells, but normal plaque-size on Vero cells. Furthermore, G₅ and G₆ were shown to be thermo-sensitive as their growth in a plaque assay on Vero cells was equal to that of HR at 34°C, but slightly reduced at 37°C (Francoeur et al., 1987). Revertants G_{5R} and G_{6R} were isolated by plating G₅ and G₆ at 39-41°C on Vero cells (Francoeur et al., 1987). The M_{M51R} (T1026) mutant was isolated in a different set of experiments from a mutagenized stock of HR (Schincariol and Howatson, 1970). It is known to harbor an M51R amino acid replacement in the M protein (Desforges et al., 2001), but the remainder of its genome had not been sequenced previously. We therefore set out to sequence the entire genome of all four G protein mutants and compared it to the parental HR virus and the M_{M51R} mutant. Sequence analysis revealed that amino acid changes in these mutants were restricted to the G glycoprotein (Table 1 and data not shown). Even though the M_{M51R} mutant shows the same D216G substitution in its G protein as mutants G₅ and G₆ (Table 1), previous studies using viral recombinants containing the mutant M protein on a wild-type background or M protein transfection showed that the M protein on its own confers the attenuated phenotype suggesting that this mutation does not affect viral replication (Ahmed et al., 2003; Black et al., 1993; Ferran and Lucas-Lenard, 1997).

VSV G mutants replicate efficiently.

If VSV G mutants are to be considered for oncolytic virotherapy, they should first be able to replicate efficiently. VSV G mutants were therefore tested for their ability to replicate on L929 cells (Figure 1). Despite mutations in the surface glycoprotein, all mutants replicated as efficiently as wild-type VSV regardless of multiplicity of infection (MOI). We also tested M protein mutant M_{M51R} replication and observed that it could also

establish a productive infection, although reduced by 100-fold when compared to G mutants.

G mutants inhibit cellular transcription as efficiently as WT VSV.

Inhibition of cellular transcription by VSV is well documented. We next aimed at determining if mutations in the G protein influenced this capacity. Figure 2 shows that all G mutants efficiently inhibited cellular transcription as early as two hours post-infection with a reduction in RNA synthesis of more than 50% of that of mock-infected cells. By 8h post-infection, cellular transcription was almost completely abolished. However, the matrix mutant M_{MS1R} failed to efficiently inhibit cellular transcription ($P < 0.001$ compared to all mutants) confirming results obtained previously (Ahmed et al., 2003).

G mutants efficiently inhibit host protein synthesis.

Having showed that VSV glycoprotein mutants could rapidly inhibit cellular transcription upon infection, we next assessed if this would correlate with their ability to inhibit cellular translation. We first determined that all G mutants efficiently synthesized their viral proteins in a pattern similar to that of wild-type VSV (Figures 3A, B). We then analyzed cellular protein synthesis during infection and observed an inhibition by all G mutants when compared to wild-type VSV although these differences did not reach statistical significance (Figure 3C). In remarkable contrast, the M_{MS1R} mutant showed only transient G protein synthesis and an inability to shutoff host protein synthesis compared to G mutants ($P < 0.05$ compared to G_5 and $P < 0.01$ compared to other G mutants).

G_{6R} induces type-I interferon secretion in infected cells.

In order to develop oncolytic virotherapy as an effective and safe treatment for cancer, healthy cells should ideally be able to protect themselves against infection while cancer cells should be sensitive to viral lysis. We therefore tested the capacity of G mutants to induce type-I interferon secretion in L929 cells following infection at MOIs of 0.1 or 20 (Figure 4). Mutants G_5 , G_{5R} and G_6 did not induce significantly higher IFN secretion than wild-type VSV at either MOIs. However, at an MOI of 0.1, mutant G_{6R}

showed rapid and strong IFN- β induction that was highly significant when compared to WT or other G mutants ($P < 0.001$) and even superior to the M_{MS1R} mutant ($P < 0.001$ at 12h and $P < 0.05$ at 24h and 36h). When an MOI of 20 was tested, G_{6R} induced readily detectable levels of IFN- β however this did not reach statistical significance.

G mutants induce death in several tumor cell lines.

To investigate whether the strong inhibition of cellular transcription and translation observed for all G mutants would provide them with increased oncolytic properties, we assessed their ability to kill various murine and human tumor cell lines *in vitro* (Figure 5). Their capacity to induce death of the murine 3LL pulmonary carcinoma (Figure 5B), the murine EL4 and human Jurkat lymphomas or the human HepG2 hepatocellular carcinoma (data not shown) was comparable to WT VSV or the M mutant. Importantly however, all G mutants were more efficient at killing murine B16 melanoma cells than the M mutant ($P < 0.001$ at 48h; $P < 0.01$ at 60h), while G_{5R} , G_6 and G_{6R} also showed a significantly faster induction of B16 cell death compared to wild-type VSV (G_{5R} and G_{6R} compared to WT $P < 0.01$ at 24h; G_6 compared to WT $P < 0.05$ at 24h) (Figure 5C). In addition, G_{5R} and G_6 showed an increased killing of MC57 fibrosarcoma cells at 48h post infection compared to WT VSV ($P = 0.01$ for G_{5R} ; $P < 0.05$ for G_6) while G_{5R} , G_6 and G_{6R} also induced a significantly higher death compared to the M mutant ($P < 0.01$) (Figure 5D). As a control, we analyzed cell death in L929 fibroblasts and showed that G mutants induce significantly slower death than the M mutant on these cells ($P < 0.01$ for G_5 , G_{5R} and G_6 and $P < 0.05$ for G_{6R} at 24h; $P < 0.001$ for G_5 , G_{5R} and G_6 at 36h) (Figure 5A). Finally, G_{5R} and G_{6R} also induced an increased death of L929 cells compared to WT ($P < 0.0001$ for G_{6R} and $P < 0.05$ for G_{5R}). We confirmed these results using a trypan blue exclusion assay that showed the same trend for L929 and B16 cell lines (data not shown).

Oncolysis correlates with apoptosis induction in cells infected with G mutants.

Finally, to determine if the observed cell death was due to increased apoptosis, caspase activation was analyzed by flow cytometry using a fluorescent irreversible inhibitor of caspase that binds to activated caspases (CaspGLOW assay). Infection of

L929 cells with VSV induced a similar increase in apoptosis over time for all G mutants and for WT VSV. In contrast, the M_{M51R} mutant showed a dramatic increase of activated caspases as early as 12 hours post-infection ($P < 0.001$) (Figure 6A) correlating with the viability assay (Figure 5). We also examined apoptosis induction in the B16 melanoma cell line (Figure 6B) and demonstrated that contrary to what we observed with L929 cells, some G mutants induce significantly more programmed cell death compared to WT VSV or the M_{M51R} mutant (G_6 compared to WT $P < 0.05$; G_{5R} , G_6 and G_{6R} compared to M_{M51R} $P < 0.01$) also correlating with the viability assay (Figure 5). We did not observe significant necrosis in any of the cell line tested or virus used (data not shown).

DISCUSSION

VSV is widely studied in the context of a growing interest for using viruses for vaccination (Braxton et al., 2010; Cobleigh et al., 2010; Geisbert et al., 2010; Schwartz et al., 2010) and the treatment of various cancers (Balachandran and Barber, 2000, 2004; Lichty et al., 2004). Glycoprotein G of VSV is responsible for viral fusion and entry into target cells. Both of these processes are critical for vaccination and oncolysis (Whitt, 2010) and likely involved in cytotoxicity and apoptosis induction (Kopecky et al., 2001). To develop such applications for an eventual use in humans, it is paramount to further study the multiple characteristics of VSV G and the various potential effects of G mutants on infected cells. We present here sequence analyses of four new VSV G protein mutants and characterize their cytopathic properties.

Mutations responsible for the phenotype of mutants G₅, G_{5R}, G₆ and G_{6R} were found to map to the G glycoprotein of VSV since comparison with parental HR isolate revealed no amino acid change in any other viral genes (Table 1). To determine whether these mutations could be linked to known phenotypic differences between mutants, a modified quantitative trait locus analysis was conducted and revealed that mutation at position 216 best correlated with thermosensitivity (Supplementary Figure 1A). Comparison of structural models and predicted total energy between mutants and the HR parental virus revealed that the acquisition of the G216D mutation by G_{5R} and G_{6R} resulted in a lower total energy for G_{6R}, a structure closer to that of the HR parental strain as well (Supplementary Figure 1B). The presence of an aspartic acid at position 216 in each thermoresistant variant (HR, G_{5R}, G_{6R}) is predicted to form an ionic bond (Supplementary Figure 1C) that could have a stabilizing effect on the protein structure and could explain thermoresistance. It is tempting to speculate that such differences in protein stability and/or structure could also possibly explain other phenotypic differences between G mutants and their revertants, like their capacity to induce interferon secretion, however a detailed mutagenesis analysis will be required to directly assess this possibility. Interestingly, the E238Q or E238G mutation found in G mutants is proximal to the dominant neutralizing epitope of VSV which could potentially modulate the

kinetics of neutralizing antibody induction leading to differences in the amount of virus reaching and infecting tumor cells (Vandepol et al., 1986b). This aspect is beyond the scope of our *in vitro* studies but will eventually need to be tested *in vivo*. The similar replication rates observed between G mutants and wild-type VSV suggest that these mutations in G do not interfere with receptor binding or with other functions involved in viral replication (Figure 1). Furthermore, cytopathic effects induced by G mutants in terms of transcription (Figure 2) and translation (Figure 3) inhibition were as strong as those induced by WT VSV. This is in agreement with previous results associating these properties to the M protein, unchanged in the G mutants studied here (Ahmed and Lyles, 1998; Ahmed et al., 2003). Specific interactions between G and M proteins on the viral particle have been observed (Ge et al., 2010) and showed to be required for final assembly of the viral particle at budding sites (Swintec and Lyles, 2008) and for the release of nucleocapsids following endocytosis (Mire et al., 2009). Again, results showing normal replication rates of VSV G mutants argue against a modification of these interactions although this was not tested directly.

Of central importance for the use of VSV for oncolytic virotherapy, and somewhat surprisingly in view of the wild-type M protein, the G_{6R} mutant induced significant type-I interferon secretion in L929 infected cells that was similar or even higher than the M_{M51R} mutant. This is particularly true at low MOI. This suggests that a different mechanism, not involving the M protein, is responsible for type-I interferon secretion in infected cells between these two mutants. Such an efficient IFN production will prime an antiviral state in tumor-surrounding healthy cells and should maintain the selectiveness of G_{6R} for cancer cells deficient in the antiviral IFN pathway presumably allowing for the safe use of G_{6R} in oncolytic virotherapy experiments. Further indirect indication for the safety of these G mutants was provided by our inability to detect any signs of toxicity following the inoculation of up to 1.5×10^9 pfu of each G mutant to C57Bl/6 mice (data not shown). However, the complete innocuity of G mutants in comparison to WT VSV or the M mutant will remain to be formally demonstrated in further *in vivo* studies. In addition, how G_{6R} maintains the ability to inhibit cellular transcription and translation while allowing IFN production will also need to be determined. Previous studies have

correlated IFN production and, more widely, primary immune responses following VSV infection with MyD88 stimulation (Wongthida et al., 2010a) through either TLR4 (Georgel et al., 2007) or TLR7 (Ahmed et al., 2009), depending on the cell type and on the viral strain considered. Mutations in G_{6R} could therefore potentially modulate the triggering of such innate pattern recognition receptors thus modifying the progression of the infection. This aspect is presently under study to explain differences observed between the cytopathogenicity of VSV G and M mutants.

Finally, for oncolytic virotherapy to be effective, cytotoxicity eventually needs to trigger cell death. We established that VSV G mutants induce cell death more efficiently in certain tumor cell lines compared to wild-type VSV or the M mutant (Figure 6). We also determined that this killing efficiency differed dramatically between viral strains and tumor lines tested as previously shown in other models (Kopecky and Lyles, 2003b). We showed that these differences correlated with a potent induction of apoptosis by VSV mutants, as was previously observed with the TP6 (G₆) mutant by Desforges *et al.* on neuroglioma cells (Desforges et al., 2002). These results emphasize the need for developing a wide range of oncolytic viruses that could be customized for tumor types or origin in specific treatment protocols.

In conclusion, VSV G mutants represent promising oncolytic viruses due to their efficient replication and strong cytopathogenicity for various cancer cell lines. With the capacity to induce IFN in normal cells, conferring selectivity for cancer cells, and mutations proximal to the major VSV neutralizing epitopes, some of these mutants could be useful to further increase our knowledge on the mechanisms involved in oncolysis. Further studies are underway to examine the *in vivo* oncolytic properties of these VSV G mutants using various murine tumor models. This will enable us to determine the full potential of VSV G mutants for oncolytic virotherapy.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Jeanne and J.-Louis Lévesque Chair in Immunovirology to A.L. from the J.-Louis Lévesque Foundation and by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to L.P. P.L holds a Canadian Institutes of Health Research (CIHR)/ Canadian association for the study of the liver (CASL) hepatology fellowship.

We would like to thank Omid Zahedi Niaki and Tanya Girard for their helpful comments on the manuscript.

REFERENCES

- Ahmed, M., and Lyles, D.S. (1998). Effect of Vesicular Stomatitis Virus Matrix Protein on Transcription Directed by Host RNA Polymerases I, II, and III. *J. Virol.* 72, 8413-8419.
- Ahmed, M., McKenzie, M.O., Puckett, S., Hojnacki, M., Poliquin, L., and Lyles, D.S. (2003). Ability of the Matrix Protein of Vesicular Stomatitis Virus To Suppress Beta Interferon Gene Expression Is Genetically Correlated with the Inhibition of Host RNA and Protein Synthesis. *J. Virol.* 77, 4646-4657.
- Ahmed, M., Mitchell, L.M., Puckett, S., Brzoza-Lewis, K.L., Lyles, D.S., and Hiltbold, E.M. (2009). Vesicular stomatitis virus M protein mutant stimulates maturation of Toll-like receptor 7 (TLR7)-positive dendritic cells through TLR-dependent and -independent mechanisms. *J. Virol.* 83, 2962-2975.
- Balachandran, S., and Barber, G.N. (2000). Vesicular stomatitis virus (VSV) therapy of tumors. *IUBMB Life* 50, 135-138.
- Balachandran, S., and Barber, G.N. (2004). Defective translational control facilitates vesicular stomatitis virus oncolysis. *Cancer Cell* 5, 51-65.
- Black, B.L., Rhodes, R.B., McKenzie, M., and Lyles, D.S. (1993). The role of vesicular stomatitis virus matrix protein in inhibition of host-directed gene expression is genetically separable from its function in virus assembly. *J. Virol.* 67, 4814-4821.
- Bordoli, L., Kiefer, F., Arnold, K., Benkert, P., Battey, J., and Schwede, T. (2008). Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nat. Protocols* 4, 1-13.
- Braxton, C.L., Puckett, S.H., Mizel, S.B., and Lyles, D.S. (2010). Protection against Lethal Vaccinia Virus Challenge by Using an Attenuated Matrix Protein Mutant Vesicular Stomatitis Virus Vaccine Vector Expressing Poxvirus Antigens. *J. Virol.* 84, 3552-3561.
- Cobleigh, M.A., Buonocore, L., Uprichard, S.L., Rose, J.K., and Robek, M.D. (2010). A Vesicular Stomatitis Virus-Based Hepatitis B Virus Vaccine Vector Provides Protection against Challenge in a Single Dose. *J. Virol.* 84, 7513-7522.

- Connor, J.H., and Lyles, D.S. (2002). Vesicular Stomatitis Virus Infection Alters the eIF4F Translation Initiation Complex and Causes Dephosphorylation of the eIF4E Binding Protein 4E-BP1. *J. Virol.* 76, 10177-10187.
- Desforges, M., Charron, J., Bérard, S., Beausoleil, S., Stojdl, D.F., Despars, G., Laverdière, B., Bell, J.C., Talbot, P.J., Stanners, C.P., and Poliquin, L. (2001). Different host-cell shutoff strategies related to the matrix protein lead to persistence of vesicular stomatitis virus mutants on fibroblast cells. *Virus Res.* 76, 87-102.
- Desforges, M., Despars, G., Bérard, S., Gosselin, M., McKenzie, M.O., Lyles, D.S., Talbot, P.J., and Poliquin, L. (2002). Matrix Protein Mutations Contribute to Inefficient Induction of Apoptosis Leading to Persistent Infection of Human Neural Cells by Vesicular Stomatitis Virus. *Virology* 295, 63-73.
- Ferran, M., and Lucas-Lenard, J. (1997). The vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits transcription from the human beta interferon promoter. *J. Virol.* 71, 371-377.
- Flood, E.A., McKenzie, M.O., and Lyles, D.S. (2000). Role of M Protein Aggregation in Defective Assembly of Temperature-Sensitive M Protein Mutants of Vesicular Stomatitis Virus. *Virology* 278, 520-533.
- Francoeur, M.A., Poliquin, L., and Stanners, C.P. (1987). The Isolation of Interferon-Inducing Mutants of Vesicular Stomatitis Virus with Altered Viral P Function for the Inhibition of Total Protein Synthesis. *Virology* 160, 236-245.
- Garcia-Sastre, A., and Biron, C.A. (2006). Type 1 Interferons and the Virus-Host Relationship: A Lesson in Detente. *Science* 312, 879-882.
- Ge, P., Tsao, J., Schein, S., Green, T.J., Luo, M., and Zhou, Z.H. (2010). Cryo-EM model of the bullet-shaped vesicular stomatitis virus. *Science* 327, 689-693.
- Geisbert, T.W., Bausch, D.G., and Feldmann, H. (2010). Prospects for immunisation against Marburg and Ebola viruses. *Rev. Med. Virol.* 20, 344-357.
- Georgel, P., Jiang, Z., Kunz, S., Janssen, E., Mols, J., Hoebe, K., Bahram, S., Oldstone, M.B.A., and Beutler, B. (2007). Vesicular stomatitis virus glycoprotein G activates a specific antiviral Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Virology* 362, 304-313.
- Glodowski, D.R., Petersen, J.M., and Dahlberg, J.E. (2002). Complex Nuclear Localization Signals in the Matrix Protein of Vesicular Stomatitis Virus. *J. Biol. Chem.* 277, 46864-46870.

- Grupe, A., Germer, S., Usuka, J., Aud, D., Belknap, J.K., Klein, R.F., Ahluwalia, M.K., Higuchi, R., and Peltz, G. (2001). In Silico Mapping of Complex Disease-Related Traits in Mice. *Science* 292, 1915-1918.
- Hoffmann, M., Wu, Y.-J., Gerber, M., Berger-Rentsch, M., Heimrich, B., Schwemmler, M., and Zimmer, G. (2010). Fusion-active glycoprotein G mediates the cytotoxicity of vesicular stomatitis virus M mutants lacking host shut-off activity. *J. Gen. Virol.* 91, 2782-2793.
- Kopecky, S.A., and Lyles, D.S. (2003a). The Cell-Rounding Activity of the Vesicular Stomatitis Virus Matrix Protein Is due to the Induction of Cell Death. *J. Virol.* Vol. 77, No. 9, 5524-5528.
- Kopecky, S.A., and Lyles, D.S. (2003b). Contrasting Effects of Matrix Protein on Apoptosis in HeLa and BHK Cells Infected with Vesicular Stomatitis Virus are due to Inhibition of Host Gene Expression. *J. Virol.* 77, 4658-4669.
- Kopecky, S.A., Willingham, M.C., and Lyles, D.S. (2001). Matrix Protein and Another Viral Component Contribute to Induction of Apoptosis in Cells Infected with Vesicular Stomatitis Virus. *J. Virol.* 75 12169-12181.
- Krissinel, E., and Henrick, K. (2004). Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallographica Section D* 60, 2256-2268.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., *et al.* (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- Le Blanc, I., Luyet, P.-P., Pons, V., Ferguson, C., Emans, N., Petiot, A., Mayran, N., Demareux, N., Faure, J., Sadoul, R., *et al.* (2005). Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. *Nat. Cell Biol.* 7, 653-664.
- Letchworth, G.J., Rodriguez, L.L., and Del Cbarrera, J. (1999). Vesicular Stomatitis. *The Veterinary Journal* 157, 239-260.
- Lichty, B.D., Power, A.T., Stojdl, D.F., and Bell, J.C. (2004). Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. *TRENDS in Molecular Medicine* 10, 211-217.
- Lyles, D.S., Puddington, L., and McCreedy, B.J.J. (1988). Vesicular stomatitis virus M protein in the nuclei of infected cells. *Journal of virology* 62, 4387-4392.

- McCreedy, B.J.J., and Lyles, D.S. (1989). Distribution of M protein and nucleocapsid protein of vesicular stomatitis virus in infected cell plasma membranes. *Virus Res.* *14*, 189-205.
- Mire, C.E., Dube, D., Delos, S.E., White, J.M., and Whitt, M.A. (2009). Glycoprotein-Dependent Acidification of Vesicular Stomatitis Virus Enhances Release of Matrix Protein. *J. Virol.* *83*, 12139-12150.
- Petersen, J.M., Her, L.S., Varvel, V., Lund, E., and Dahlberg, J.E. (2000). The matrix protein of vesicular stomatitis virus inhibits nucleocytoplasmic transport when it is in the nucleus and associated with nuclear pore complexes. *Molecular Cell Biology* *20*, 8590-8601.
- Roche, S., Bressanelli, S., Rey, F.A., and Gaudin, Y. (2006). Crystal Structure of the Low-pH Form of the Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G. *Science* *313*, 187-191.
- Roche, S., Rey, F.A., Gaudin, Y., and Bressanelli, S. (2007). Structure of the Prefusion Form of the Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G. *Science* *315*, 843-848.
- Rose, J.K., and Whitt, M.A. (2001). Rhabdoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe D.M., Howley P.M. (eds). *Fields Virology*, 4th edn (Philadelphia).
- Schincariol, A.L., and Howatson, A.F. (1970). Replication of vesicular stomatitis virus : I. Viral specific RNA and nucleoprotein in infected L cells. *Virology* *42*, 732-743.
- Schuler, L., Daura, X., and van Gunsteren, W. (2001). An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase. *Journal of Computational Chemistry* *22*, 1205-1218.
- Schwartz, J.A., Buonocore, L., Suguitan, A.L., Jr., Silaghi, A., Kobasa, D., Kobinger, G., Feldmann, H., Subbarao, K., and Rose, J.K. (2010). Potent Vesicular Stomatitis Virus-Based Avian Influenza Vaccines Provide Long-Term Sterilizing Immunity against Heterologous Challenge. *J. Virol.* *84*, 4611-4618.
- Stark, G.R., Kerr, I.M., and Williams, B.R. (1998). How cells respond to interferons. p. 227.
- Stojdl, D.F., Lichty, B., Knowles, S., Marius, R., Atkins, H., Sonenberg, N., and Bell, J.C. (2000). Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat. Med.* *6*, 821-825.
- Stojdl, D.F., Lichty, B.D., tenOever, B.R., Paterson, J.M., Power, A.T., Knowles, S., Marius, R., Reynard, J., Poliquin, L., Atkins, H., *et al.* (2003). VSV strains with defects in their

- ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* 4, 263-275
- Sun, X., Yau, V.K., Briggs, B.J., and Whittaker, G.R. (2005). Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology* 338, 53-60.
- Swintek, B.D., and Lyles, D.S. (2008). Plasma Membrane Microdomains Containing Vesicular Stomatitis Virus M Protein Are Separate from Microdomains Containing G Protein and Nucleocapsids. *J. Virol.* 82, 5536-5547.
- Vandepol, S.B., Lefrançois, L., and Holland, J.J. (1986). Sequences of the Major Antibody Binding Epitopes of the Indiana Serotype of Vesicular Stomatitis Virus. *Virol. J.* 148, 312-325.
- Wagner, E.K., and Hewlett, M.J. (2004). *Basic Virology*, 2 edn (État-Unis).
- Whitt, M.A. (2010). Generation of VSV pseudotypes using recombinant [Delta]G-VSV for studies on virus entry, identification of entry inhibitors, and immune responses to vaccines. *J. Virol. Methods* 169, 365-374.
- Wollmann, G., Rogulin, V., Simon, I., Rose, J.K., and van den Pol, A.N. (2010). Some Attenuated Variants of Vesicular Stomatitis Virus Show Enhanced Oncolytic Activity against Human Glioblastoma Cells relative to Normal Brain Cells. *J. Virol.* 84, 1563-1573.
- Wongthida, P., Diaz, R.M., Galivo, F., Kottke, T., Thompson, J., Melcher, A., and Vile, R. (2010). VSV Oncolytic Virotherapy in the B16 Model Depends Upon Intact MyD88 Signaling. *Mol. Ther.*
- Ye, Z., Sun, K., Suryanarayana, K., Justice, P., Robinson, D.G., and Wagner, R.R. (1994). Membrane-binding domains and cytopathogenesis of the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *Journal of virology* 68, 7386-7396.

Table 1. Amino acid sequence of the glycoprotein of G mutants.
 Amino acid differences between the glycoproteins of G mutants
 and of the M mutant or the parental WT VSV.

	100	216	226	238	415	471
WT	K	D	R	E	S	Y
G ₅	R	G		Q		
G _{5R}	R			Q		
G ₆		G		G		
G _{6R}				G		
M _{M51R}		G	H		A	H

Amino acids are numbered according to their position on the mature protein.

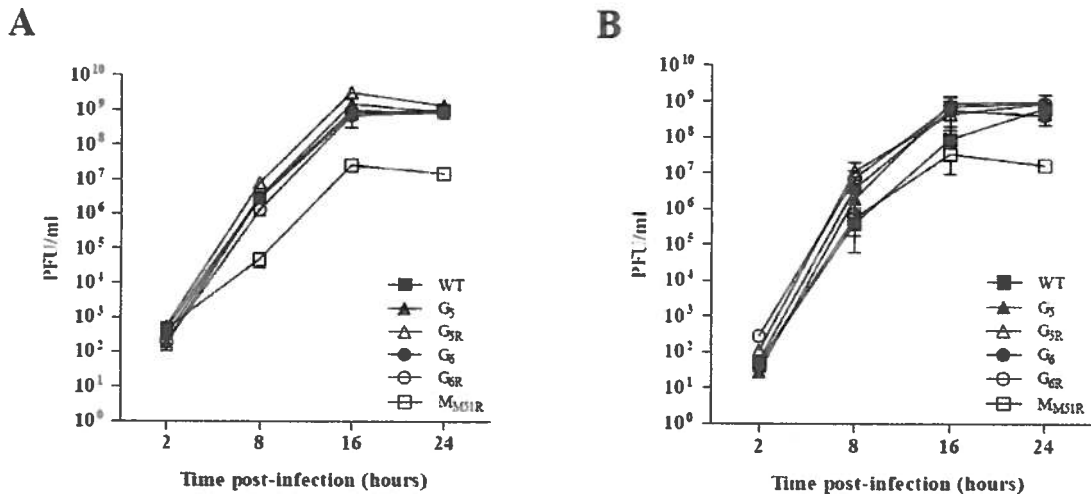


Figure 1. Viral replication rates of VSV G mutants. L929 cells were infected at an MOI of (A) 0.1 or (B) 20. At the indicated time points, supernatants were harvested and viral titers determined by plaque assay on Vero cells. Data are the mean \pm SEM of three independent experiments.

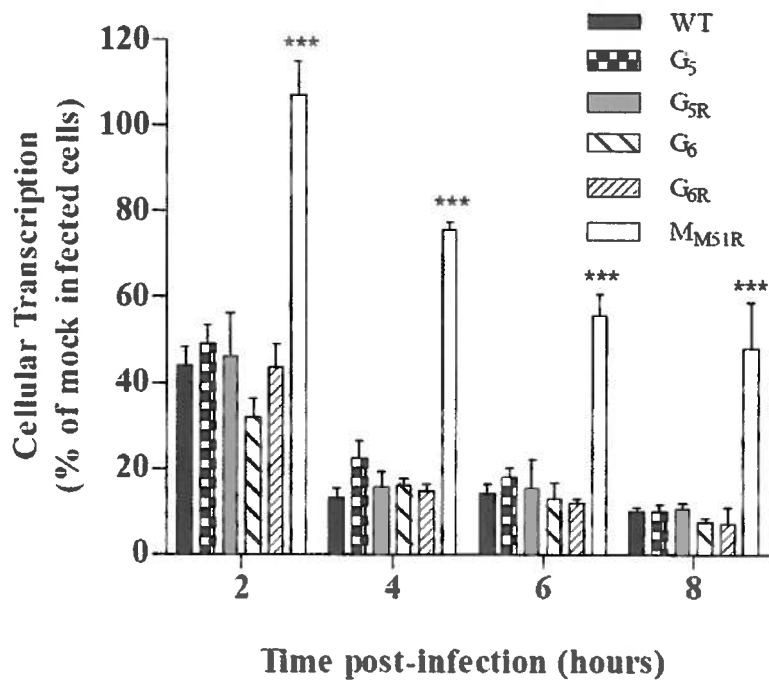


Figure 2. Effect of VSV G mutants on cellular transcription rates. L929 cells were infected at an MOI of 20 or mock-infected. At the indicated time points, cells were labeled with ³H-uridine (10 μ Ci/mL) and harvested. Acid-precipitable radioactivity was measured by scintillation counting. Data are the mean \pm SEM of three independent experiments in duplicates, *** P < 0.001.

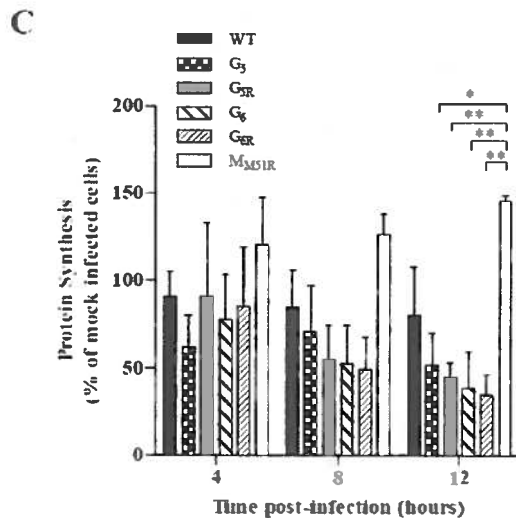
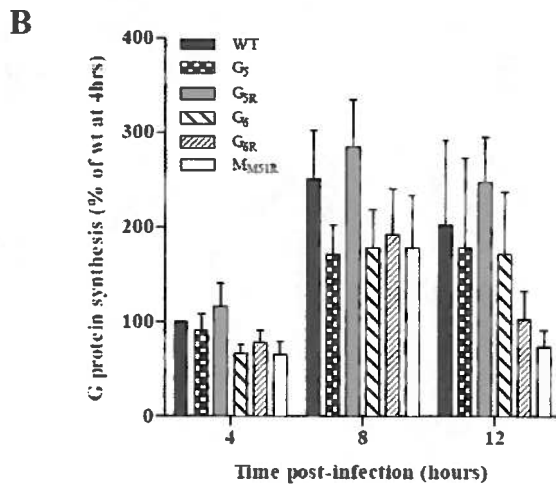
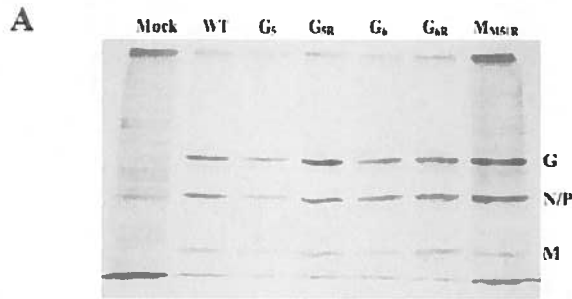


Figure 3. Effect of VSV G mutants on cellular protein synthesis rates.

L929 cells were infected at an MOI of 20 or mock-infected. Cells were labeled with ³⁵S-methionine/cysteine (50μCi/mL) at 4, 8, and 12 hours post-infection. Lysates were subjected to SDS-PAGE, and labeled proteins were quantified. (A) Representative image of an autoradiography film showing radio-labeled proteins at 8 hours post-infection. Positions of viral proteins are indicated on the right. (B) The labeled G proteins in images similar to that of panel A were quantified using the AlphaImager 3400 software. Results, corrected for the background, are shown as a percentage of the WT-infected control at 4 hours post-infection and are the mean ± SEM of four independent experiments. (C) Acid-precipitable radioactivity was measured by scintillation counting for the determination of total protein synthesis. Results are shown as a percentage of the mock-infected control and are the mean ± SEM of three independent experiments, **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

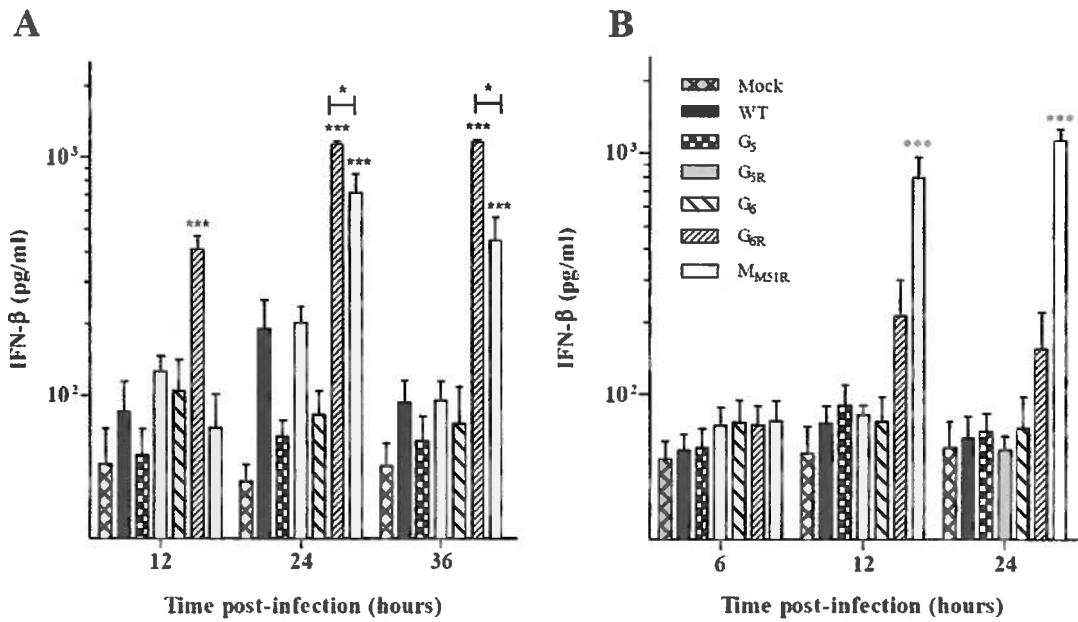
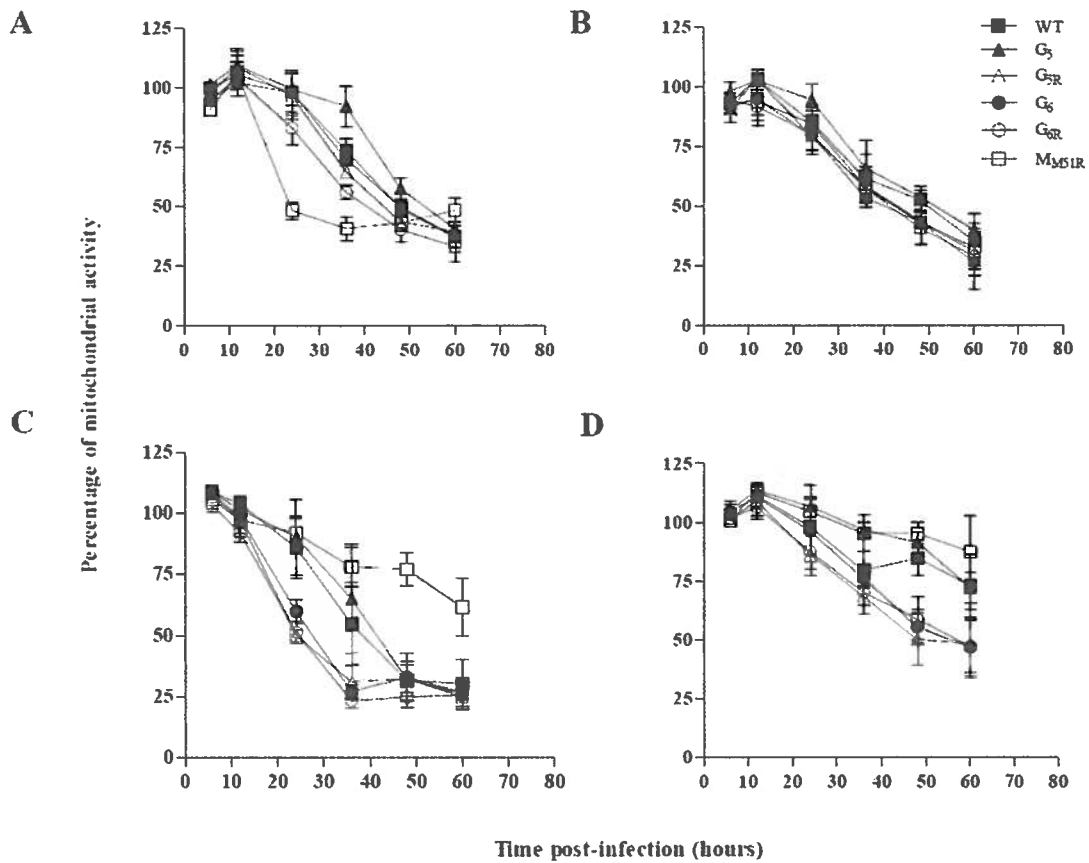


Figure 4. Interferon induction by VSV G mutants. L929 cells were infected at an MOI of (A) 0.1, (B) 20. At the indicated time points, supernatants were collected and IFN- β quantification was performed by ELISA. Data are the mean \pm SEM of four independent experiments in duplicates, *** $P < 0.001$.



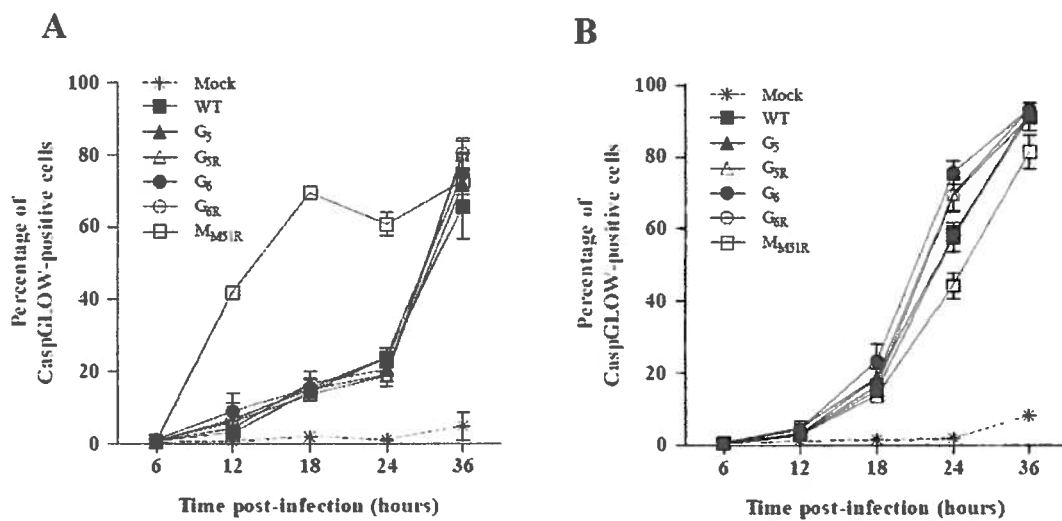
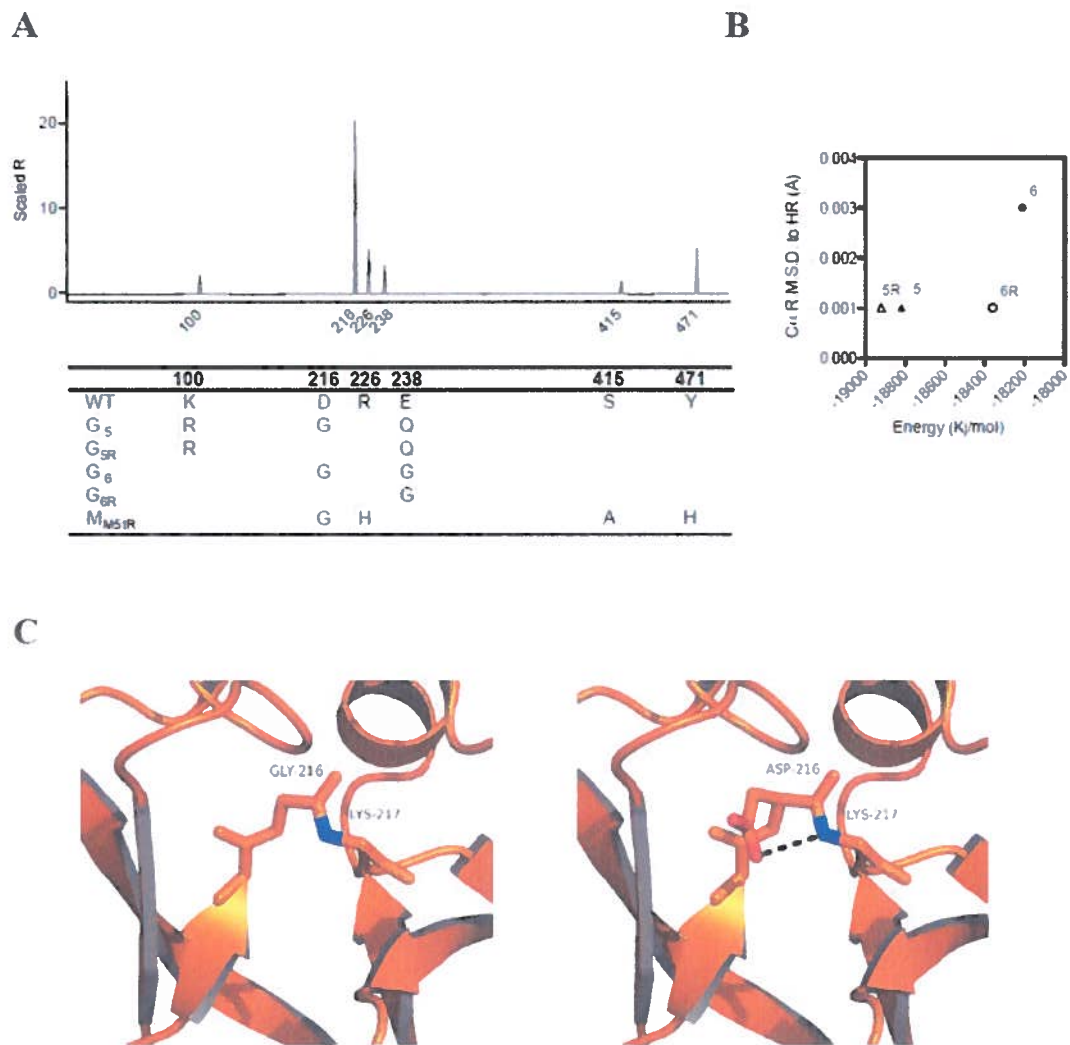


Figure 6. Caspase activation by VSV G mutants. (A) L929 and (B) B16 cells were infected at an MOI of 20 or mock-infected. At the indicated time points, kinetics of caspase activity was determined by labeling the cells with CaspGLOW reagent. Data are the mean \pm SEM of three independent experiments.



Supplementary Figure 1. Sequence and structural analysis of VSV G mutants. (A) Correlation analysis in thermosensitive and thermoresistant G protein mutants by modified quantitative trait locus analysis and summary of amino acid differences between mutants and parental strains. Amino acids are numbered according to their position on the mature protein. (B) Total energy and root mean square structural deviation (R.M.S.D.) from the WT structure of homology-based structural model of each mutant. (C) Structural analysis of G protein from a thermosensitive (left) or thermoresistant (right) mutant.

2. Caractérisation du potentiel immunomodulateur de mutants du virus de la stomatite vésiculaire dans le traitement du mélanome murin.

Suite à la caractérisation des mutants de G du VSV et la découverte de leur potentiel oncolytique important sur les cellules de mélanome murin B16, nous avons tenu à établir le lien entre leur phénotype en culture cellulaire et leur potentiel oncolytique *in vivo*. Il a déjà été démontré qu'une réponse immunitaire antitumorale dépendante des lymphocytes T CD8⁺ peut être induite par un traitement avec VSV dû au relargage d'antigènes tumoraux générés par la lyse des cellules cancéreuses dans un contexte pro-inflammatoire (Diaz et al., 2007; Galivo et al., 2010). Nous avons donc voulu comparer les différents mutants du VSV (G et M) avec la souche parentale pour faire la lumière sur ce qui rend ces virus plus ou moins aptes à contrôler la croissance tumorale.

Cet article établit donc la relation entre le recrutement de cellules immunitaires au site tumoral, le niveau d'activation, de fonctionnalité et de cytotoxicité de la réponse immunitaire dirigée contre le virus et contre un antigène tumoral de même que la survie des souris traitées avec les divers mutants du VSV. Il démontre également qu'une mutation sur la protéine de la matrice peut directement moduler l'expression des molécules de CMH-I à la surface des cellules tumorales et ainsi participer à l'initiation d'une réponse immunitaire antitumorale.

2.1 Article 3. « The strength of the T cell response against a surrogate tumor antigen induced by oncolytic VSV therapy does not correlate with tumor control. » (Soumis à *Molecular Therapy*).

Contribution des différents auteurs

VJ : Conception de l'étude, expérimentations et rédaction de l'article

MPL : Aide aux expérimentations (sacrifice des souris et traitement des organes)

PL : Aide aux expérimentations (manipulation des cellules et analyses de cytométrie pour la figure de modulation des molécules de CMH-I), lecture et commentaires aidant la rédaction de l'article

TC : Aide aux expérimentations (prises de sang des souris pour les tests de cinétique de neutralisation virale)

LP : Supervision et rédaction de l'article

AL : Supervision et rédaction de l'article

**THE STRENGTH OF THE T CELL RESPONSE AGAINST A SURROGATE
TUMOR ANTIGEN INDUCED BY ONCOLYTIC VSV THERAPY DOES NOT
CORRELATE WITH TUMOR CONTROL.**

Valérie Janelle^{1,2}, Marie-Pierre Langlois¹, Pascal Lapierre¹, Tania Charpentier¹, Laurent
Poliquin², Alain Lamarre^{1,2}

Affiliations : ¹ Immunovirology laboratory, Institut national de la recherche scientifique,
INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada

² Biomed Research Center, Department of Biology, Université du Québec à
Montréal, Montréal, Québec, Canada

Correspondance to : A. Lamarre, Immunovirology Laboratory,
Institut national de la recherche scientifique,
INRS-Institut Armand-Frappier,
Laval, Québec, Canada, H7V 1B7
Phone : 450-687-5010 ext. 4262
Fax : 450-686-5501
E-mail : alain.lamarre@iaf.inrs.ca

Short title : Antitumor immune response induced by VSV mutants.

ABSTRACT

Cancer therapy using oncolytic viruses has gained interest in the last decade. Vesicular stomatitis virus is a well-characterized candidate for this alternative treatment. However, the relative contribution of the antitumoral immune response induced by virotherapy versus the intrinsic oncolytic activity of viruses to the treatment outcome has been difficult to assess. To start addressing this question, we compared glycoprotein and matrix mutants of VSV, showing different oncolytic potentials for B16/B16gp33 melanoma tumor cells *in vitro*, with the wild-type virus in their ability to induce tumor-specific CD8⁺ T cell responses and control tumor progression *in vivo*. Despite the fact that wild-type and G mutants, but not the M_{M51R} mutant, induced a significant gp33-specific immune response, all VSV strains showed a similar capacity to slow down tumor progression when compared to mock-treated animals. VSV matrix mutant induced the upregulation of MHC-I at the tumor cell surface thus favoring recognition by CD8⁺ T cells. These results demonstrate that VSV mutants affect the induction of an antitumor immune response using several mechanisms. A better understanding of such mechanisms will prove useful for the rational design of viruses with improved therapeutic efficacy.

Key words: oncolytic; VSV; immunotherapy; cytotoxic T cells; melanoma

INTRODUCTION

In recent years, oncolytic virotherapy has emerged as an alternative therapy against cancer showing great potential. Oncolytic tumor regression *in vivo* has been shown to be a multifactorial process involving viral gene expression and direct cell lysis, as well as the recruitment of immune effector cells directed against infected tumor cells (Diaz et al., 2007; Galivo et al., 2009; Prestwich et al., 2009; Toda et al., 1999; Wongthida et al., 2010). A well-characterized oncolytic virus being developed for such purpose is the prototypic *Rhabdoviridae* vesicular stomatitis virus (VSV). VSV possesses intrinsic oncolytic properties since it replicates more efficiently in type-I interferon-defective cells, a pathway frequently impaired during tumorigenesis (Naik and Russell, 2009; Stojdl et al., 2000). Several successful preclinical and clinical studies against prostate, breast, colorectal and liver cancers (Ahmed et al., 2010; Chang et al., 2010; Heo et al., 2013b; Huang et al., 2003), as well as melanoma (Fernandez et al., 2002) and glioblastoma (Ozduman et al., 2008) indicate that VSV oncolytic therapy is a promising alternative treatment against a number of cancer types. In addition to the direct lysis of cancer cells, VSV treatment also generates a CD8⁺ T cell dependent tumor-specific immune response that is induced following the release of tumor antigens by infected cells in a proinflammatory environment (Diaz et al., 2007). However, this tumor-specific immune response generated following VSV treatment is usually weak and leads only to a partial control of tumor growth. Hence, the causes for the high variability in the outcomes of VSV oncolytic therapy need to be better understood (Rommelfanger et al., 2012).

Recently, our group has characterized various VSV glycoprotein (G) mutants (Janelle et al., 2011). G mutants interfere with host cell metabolism by inhibiting cellular transcription and translation in a kinetic similar to the WT virus as opposed to the prototypic matrix (M) mutant (M_{M51R}) that is slightly attenuated *in vitro* (Janelle et al., 2011). G mutants proved to be especially cytolytic for B16 melanoma cells. One such mutant (G_{6R}) also maintains the ability to induce type-I interferon in non-cancerous cell lines at levels similar to the M_{M51R} mutant suggesting that it could be a safe and potentially more effective alternative to M_{M51R}. Furthermore, G mutants can still induce the translocation of calreticulin at the cell membrane

following infection while the M_{M51R} mutant has lost this ability (Janelle et al., 2013). This endoplasmic reticulum-resident protein has been shown to function as a phagocytosis signal for dendritic cells (Obeid et al., 2007) and is likely to induce immune-mediated cell death *in vivo* as well as to influence the antitumor immune response generated by these viruses.

Given the general ability of VSV to induce tumor-specific cytotoxic T cells and the effects of VSV mutants on cancer cells *in vitro*, we sought to compare their immunomodulatory potential and correlate the antitumor response with survival in a B16/B16gp33 melanoma mouse model. Herein, we show that, while the M_{M51R} mutant induced the weakest gp33-specific antitumoral $CD8^+$ T cell immune response compared to WT or G mutants, it could nonetheless induce a functional antitumoral CTL response that was very efficient at controlling tumor progression. We found that this discrepancy was not a matter of specific $CD8^+$ T lymphocytes exhaustion since neither PD-1 nor PD-L1 blockade enhanced virotherapy in this system. However, we show that targeting and lysis by $CD8^+$ T cells of tumor cells reflected the ability of M_{M51R} to upregulate class I MHC on tumor cells after infection.

RESULTS

Wild-type and mutant VSV strains are similarly cleared from B16 tumors *in vivo* and induce the rapid production of neutralizing antibodies.

Given that *in vitro* experiments had shown that VSV G mutants were as cytolytic as WT VSV for B16 melanoma cells whereas the M_{M51R} mutant could less efficiently affect B16 metabolism (Janelle et al., 2011), we first wanted to assess whether the different VSV mutants persisted in B16 tumors for different periods of time *in vivo*. In this experimental condition, infectious virus titers for all VSV strains studied declined with similar kinetics and all strains were cleared from the tumor site between four and six days post-infection indicating that the *in vitro* replication rates of VSV in B16 cells did not significantly affect viral clearance kinetics *in vivo* (Fig. 1a). Due to the rapid elimination of infectious virus within the tumor tissue, three intratumoral infections were performed in every following treatment to induce local inflammation for a longer period of time. Despite this, no replicative virion could be detected at the tumor site four days after the last VSV dose neither for the WT nor the various mutants (data not shown).

WT VSV and the M_{M51R} mutant are actively being developed for clinical oncolytic applications (Diaz et al., 2007; Nguyễn et al., 2008). For obvious safety reasons, virus replication has to be limited both in space and time, which restricts virus availability for oncolysis. For VSV, this is achieved through the rapid generation of neutralizing antibodies. Thus, we compared the kinetics of neutralizing antibody development against each mutant (Fig. 1b). Total VSV-specific neutralizing immunoglobulins (mainly composed of IgMs in the first few days) were detectable for all VSV strains by day 4 following the first VSV injection correlating with viral clearance kinetics. Class switching to neutralizing IgGs occurred by day 8. Of note, neutralizing IgGs were detected as early as day 4 after G_{6R} treatment. The neutralizing antibody response reached its maximum level between 8 and 12 days post-infection. G_{6R} and WT VSV induced the strongest and fastest humoral response, followed by G_6 , while the matrix mutant M_{M51R} generated a weaker humoral response. Since no virus could be detected for any viral strain neither in the tumor nor the spleen 4 days after the last injection, we conclude that the anti- M_{M51R} neutralizing antibody response was

sufficient to clear infection. We also analyzed the cross-neutralization ability of the antibodies elicited by the mutants to neutralize WT VSV. We found that even though the point mutations found in the glycoprotein of G₆ and G_{6R} mutants lie in close proximity to the dominant neutralizing B-cell epitope (Vandepol et al., 1986), cross-neutralization occurred for all mutants. These results suggest that all VSV mutants should be safe oncolytic agents because they are rapidly cleared *in vivo*, however this will likely limit the treatment efficacy window.

VSV treatment promotes immune cell infiltration.

Since the generation of an efficient tumor-specific immune response is important for sustained tumor control, we characterized tumor infiltration by immune cells following VSV treatment. Using the B16 melanoma model expressing the surrogate tumor antigen gp33, we found that infection with VSV G or M mutants doubled the percentage of infiltrating immune cells while WT VSV increased their proportion by 5-fold (**Fig. 2a**). VSV treatment had little to no effect on the proportions of CD4⁺ T cells, B cells, natural killer (NK) cells, neutrophils or macrophages (**Fig. 2b**). However, each VSV treatment decreased the proportion of intratumoral regulatory T cells. We also found a dramatic decrease in the numbers of intratumoral dendritic cells following infection. Furthermore, VSV treatment slightly increased myeloid-derived suppressor cells (MDSC). Nevertheless, the main difference was found within the CD8⁺ T cell subset that doubled with treatment with WT, G₆ and G_{6R} mutants (**Fig. 2c**). Only G₆ and G_{6R} mutants significantly increased the CD8/CD4 ratio in the tumor (**Fig. 2d**). Thus, VSV virotherapy induced immune cell infiltration in the tumor and G mutants favored an increased CD8/CD4 T cell ratio.

VSV treatment induces a functional antitumor CTL response.

To evaluate the local and systemic T cell activation induced by VSV oncolytic therapy, we compared the activation status of CD4⁺ and CD8⁺ T cells found in the tumor and spleen. Based on L-selectin (CD62L) and CD44 expression, we found no difference in the activation status of CD4⁺ T cells between treated and non-treated animals (data not shown) correlating with the weak CD4⁺ T cell infiltration observed (**Fig. 2b**). However, a decrease in naive splenic and intratumoral CD8⁺ T cells was noted as well as a slight increase in effector

CD8⁺ T cells following VSV infection (**Fig. 3a**). As expected at this early stage of the immune response, very few central memory T cells were found.

We also characterized the expression of Programmed cell-death (PD)-1 at the cell surface. PD-1 is expressed upon TCR activation, contributes to the contraction of the immune response and is expressed by exhausted T cells. In contrast to the M mutant, treatment with WT VSV or G mutants induced a strong systemic activation of CD8⁺ T cells as shown by the high proportion of CD8⁺ PD-1⁺ T cells in the spleen (**Fig. 3b**). However, PD-1 overexpression may also indicate the development of an exhausted phenotype. As for intratumoral CD8⁺ T lymphocytes, cells found locally were mainly PD-1 positive. These results suggest that VSV strains with an intact M protein induce T cell activation.

VSV treatment has been shown to induce limited gamma interferon (IFN- γ) secretion by adoptively transferred tumor-specific CD8⁺ T cells in draining lymph nodes (Wongthida et al., 2011), hence we characterized the systemic antitumor response of endogenous splenic CD8⁺ T cells. We first compared the cytokine secretion profile (TNF α and IFN γ) of CD8⁺ T cells. We found a robust antiviral CTL response against VSV independently of the mutant used (**Fig. 3c**). VSV strains containing an intact matrix protein could mount the strongest CD8⁺ T cell response against the gp33 surrogate tumor epitope when compared to non-treated animals. Furthermore, treatment with G_{6R} induced a more polyfunctional antitumor CD8⁺ T cell response with more cells secreting both TNF α and IFN γ .

Effector CD8⁺ T cells kill cancer cells via the degranulation of their cytotoxic content. VSV-specific cytotoxic T cells (CTLs) were found in the spleen of treated animals, likely contributing to the elimination of infected cells (**Fig. 3d**). VSV treatment additionally generated gp33-specific CTLs with the M mutant not reaching significance. In addition, CTLs against the self tumor-associated antigens TRP-2 and gp100 were also detectable in every case although not in proportions significantly above that of non-treated mice.

Levels of gp33-specific T cell responses do not correlate with prolonged mice survival.

We then sought to determine if the ability of VSV mutants to induce a gp33-specific T cell responses correlated with an improved therapeutic efficacy. Surprisingly, although the G_{6R} mutant was the most potent in terms of polyfunctional antitumor CD8⁺ T cell induction, it did not slow down tumor progression significantly more than other VSV mutants nor WT VSV (Fig. 4). Oppositely, treatment with the M mutant, although it was the poorest at inducing gp33-specific T cell responses, prolonged mice survival to a similar degree as the WT or G mutants. Altogether, these results demonstrate that the capacity to induce a stronger immune response against the gp33 surrogate tumor epitope does not necessarily correlate with improved therapeutic efficacy.

VSV oncolytic therapy efficacy is CD8⁺T cell dependent.

Since M_{M51R} treatment led to prolonged mice survival despite a reduced CTL response against the surrogate tumor antigen gp33, we assessed whether tumor-specific CD8⁺ T lymphocytes were important for tumor control. To do so, we adoptively-transferred purified CD8⁺ T cells, harvested 4 days after the last VSV treatment of B16gp33 melanoma-bearing mice, into naive mice. We then inoculated recipient mice with the parental B16 tumor cell line and followed tumor progression. We found that tumor-specific CD8⁺ T lymphocytes generated following treatment with VSV mutants are a major factor in tumor control and can slow down tumor growth efficiently (Fig. 5a). However, tumor-specific CD8⁺ T cells generated by treatment with WT VSV did not significantly slow-down B16 tumor progression even if a strong and functional gp33-specific immune response was induced. On the other hand, CD8⁺ T cells harvested from M_{M51R}-treated mice efficiently controlled tumor burden despite the fact that this virus induced a poor gp33-specific T cell response. Transfer of CD8⁺ T cells from VSV G₆₋, G_{6R-} and M_{M51R}-treated B16gp33-bearing mice correlated with better survival rates (Fig. 5b). These results show that the strength of the immune response induced against a surrogate tumor antigen does not adequately predict tumor control *in vivo* and suggest that the M_{M51R} mutant may be able to induce a protective CTL response against a broader pool of endogenous tumor antigens using different mechanisms when compared to the WT virus or G mutants.

VSV infection modulates the expression of cell-surface molecules.

Tumor cells have been shown to express PD-L1 in certain conditions (Okazaki and Honjo, 2007). We therefore characterized its expression as well as of its receptor PD-1 on B16gp33 cells upon VSV infection *in vitro*. Surprisingly, VSV infection induced the upregulation of PD-1 (**Fig. 6a**) on B16 cells while only the M_{M51R} mutant led to PD-L1 upregulation (**Fig. 6b**) compared to mock-infected cells, potentially providing a mechanism explaining the discrepancy with other VSV strains in terms of gp33-specific T cell response induction. We tested several other cell lines of mice and human origins and discovered that various transformed and non-transformed cell lines (human hepatocarcinoma HepG2 cells, L929 mouse fibroblasts or Vero monkey kidney cells) upregulate PD-1 when infected with VSV (data not shown). While the biological significance of this observation remains unknown, PD-1 expression in response to VSV infection could potentially affect virotherapy efficacy.

MDSC present within the tumor microenvironment can also express PD-L1 (Gabrilovich and Nagaraj, 2009) which can negatively regulate T cell responses via interaction with PD-1 thus suppressing their effector functions (Okazaki and Honjo, 2007; Parry et al., 2005). VSV treatment slightly increased the proportions of MDSC (**Fig. 2c**), while VSV infection modulated PD-1 and/or PD-L1 expression on tumor cells *in vitro*. Therefore we sought to determine if PD-1 or PD-L1 blockade could enhance virotherapy *in vivo*. Based on the number of antigen-specific CD8⁺ T cells able to secrete IFN γ and/or degranulate (CD107a and granzyme B expression), we found that PD-1 and PD-L1 blockade influenced only the VSV-specific T cell response (**Fig. 6c-f**) and not the tumor-specific immune response (data not shown). While PD-1 blockade slightly increased anti-VSV CD8⁺ T cell functionality, anti-PD-L1 treatment increased VSV-specific CD8⁺ T cell cytotoxicity. The lack of effect on the antitumoral immune response observed following blockade of the PD-1 pathway is further correlated with the fact that VSV infection failed to modulate PD-1 or PD-L1 expression at the tumor cell surface *in vivo* (data not shown).

VSV matrix mutant modulates the expression of cell-surface class I MHC on tumor cells.

We then characterized the expression of class I major histocompatibility complex (MHC-I) at the surface of B16 cells following VSV infection. As expected, MHC-I is downregulated upon *in vitro* infection with WT VSV or the G mutants (Fig. 7a). Strikingly, the M_{M51R} mutant tripled MHC-I surface expression on B16gp33 cells 24 hours postinfection. We confirmed this phenomenon *in vivo* (Fig. 7b) and showed that TCR-transgenic $CD8^+$ T cells recognizing the gp33 epitope could be activated to a greater extent when incubated with dissociated B16gp33 tumor cells from M_{M51R} -treated mice (Fig. 7c). This suggests that the VSV matrix protein may limit MHC-I expression at the cell surface and that this effect is abolished by the *M51R* mutation allowing for its upregulation. This process could be a contributing factor for the ability of M_{M51R} treatment to induce an efficient antitumoral $CD8^+$ CTL response.

DISCUSSION

Oncolytic virotherapy has proven to be a promising cancer treatment in several successful clinical studies (Galanis et al., 2010; Heo et al., 2013a; Reid et al., 2002). VSV, one of the most studied prototypic oncolytic viruses, is now in clinical trials for liver cancer treatment in the United States (NCT01628640). However, a number of questions remain unanswered about the mechanisms that contribute to virotherapy efficacy. One such question is the relative contribution of the immune response versus the intrinsic oncolytic activity of a particular virus to the treatment outcome. To address this question and assess if a virus mutational status impacts the antitumoral immune response, we sought to determine the ability of WT, M and G VSV mutants to induce tumor-specific immune responses and control tumor progression.

We found that the *in vitro* replication potential of the various VSV strains studied did not correlate with their respective capacity to persist in tumor tissue *in vivo*. Since point mutations in the G₆ and G_{6R} mutants are proximal to the dominant neutralizing VSV epitope (Vandepol et al., 1986), we tested whether the development of the neutralizing antibody response against the G mutants was affected compared to the M mutant or WT VSV. G mutants induced a similar neutralizing antibody response with an efficient class switch to IgGs, contributing to their fast and effective clearance. Point mutations could have also modified the cross-neutralization ability of the antibodies induced. However, mutations in G₆ and G_{6R} did not impair neutralization of the WT viral particle. Interestingly, we observed a reduced neutralizing antibody response after M_{M51R} virus infection. This decreased B cell response along with the diminished CTL response observed against VSV M_{M51R} may in fact allow for the establishment of a broader antitumoral response. While the WT, G₆ and G_{6R} mutants induce a stronger antiviral response, this response may limit the ability of VSV to induce a T cell response to tumor antigens.

Wild-type VSV was the most potent at promoting tumor infiltration by immune cells. Characterization of immune subpopulations within the tumor microenvironment showed a large proportion of T and B cells, as well as MDSC. VSV treatment also led to a decreased

number of intratumoral DCs, as previously described (Leveille et al., 2011), and increased CD8⁺ T cells. Therefore, treatment with VSV contributes to the establishment of an inflammatory milieu within the tumor that in turn leads to the recruitment of immune mediators. All three viruses containing an intact matrix protein (WT, G₆ and G_{6R}) induced a better CTL response against the surrogate tumor antigen gp33 compared to non-treated mice. It is important to point out that the differences in the immune response induced by the various VSV strains are not correlated with a disparity in their replicative ability but appears to be strictly resulting from their respective mutation(s).

To analyze the overall immune response induced by each VSV strain, we analyzed T cell responses against other tumor-associated antigens. The group of melanoma differentiation antigens includes proteins such as MART-1, gp100, tyrosinase, gp75/tyrosinase-related protein (TRP)-1, and TRP-2 and are expressed by normal and malignant melanocytes both in human and mice (Parkhurst et al., 1998). However, in contrast to the immunogenic surrogate tumor antigen gp33, gp100 and TRP-2 are also expressed by normal melanocytes contributing, with other factors, to their poor immunogenicity. Furthermore, most of the antigen-specific T cells against these self-antigens are deleted or tolerized resulting in an inefficient immunity owing to preexisting tolerance (Bloom et al., 1997). CTLs against these antigens were detectable in our model but are unlikely to influence tumor regression at these level.

In a previous study, we found that the G₆ and G_{6R} mutants were highly cytopathic for B16 cells *in vitro* compared to the M mutant (Janelle et al., 2011). Here, we show that apart from inducing a strong antiviral CTL response, which may facilitate the concomitant uptake of infected tumor antigens, they also initiate a tumor-specific polyfunctional CTL response. Treatment with the M_{M51R} mutant failed however to generate a significant CTL response against the gp33 surrogate tumor antigen compared to non-treated animals. Nevertheless, treatment with all VSV strains significantly prolonged survival compared to non-treated mice. Unexpectedly, the increased functional anti-gp33 CD8⁺ T cell response induced by G_{6R} treatment did not lead to a better tumor control whereas the poor anti-gp33 CD8⁺ T cell response elicited by the M_{M51R} treatment did not worsen survival. Since differences between

mutants in both virus availability and robustness of the gp33-specific immune response did not correlate with survival, we assessed whether the antitumoral CD8⁺ T cell response was critical for the outcome of VSV oncolytic therapy. Adoptive transfer experiments revealed that T cells from WT-treated mice could not by themselves control parental B16 tumor growth. However, CD8⁺ T cells harvested from G_{6R}-treated animals that generated a polyfunctional gp33-specific immune response achieved tumor control as did CD8⁺ T cells from M_{M51R}-treated mice. Taken together, these results indicate that induction of strong CTL responses against surrogate tumor antigens is not a good predictor of treatment efficacy suggesting that the overall response against a diverse tumor antigen repertoire is probably more important.

VSV treatment was also associated with a diminution of naive CD8⁺ T cells within the spleen and with the upregulation of PD-1 expression. Expectedly, T cells found in the tumor microenvironment were mainly of an activated phenotype since downregulation of L-selectin is required to cross the vascular endothelium and migrate into the tumor. We also found that the M_{M51R} mutant induced much less PD-1 expression on CD8⁺ T cells in the spleen than the G mutants or WT VSV. Acute VSV infection does not usually lead to T cell exhaustion, but this immune dysfunction has been reported in cancer (Speiser, 2012). However, it is more likely here that the strong VSV replication induced a robust T cell activation and PD-1 upregulation followed by a rapid contraction of the immune response; WT VSV potentially leading to an early contraction phase. On the opposite, the weaker cytopathic properties of the VSV M mutant could explain why fewer CD8⁺ T cells express PD-1 following infection. Surprisingly, *in vitro* infection of B16gp33 melanoma cells also induced the expression of PD-1. To explore if this was of biological relevance, we combined VSV treatment with PD-1 or PD-L1 blockade. We observed no significant improvement over VSV treatment alone. This result is compatible with our subsequent observation that VSV infection *in vivo* failed to modulate these markers.

We next examined other surface molecules that could be induced following VSV infection to explain the efficacy of the M_{M51R} treatment despite the poor anti-gp33 response. Strikingly, VSV M mutant infection could induce the upregulation of MHC-I expression at

the tumor cell surface both *in vitro* and *in vivo*. The VSV matrix protein was shown to alter CD1d trafficking, a molecule structurally similar to MHC-I (Brutkiewicz et al., 1995; Calabi and Bradbury, 1991), inhibiting antigen presentation to, among other things, natural killer T (NKT cells) (Renukaradhya et al., 2008). Furthermore, other viruses, like the poxvirus Orf or myxoma virus, have been found to interfere with antigen presentation by impairing MHC-I surface expression due to the disruption of the Golgi apparatus or the loss of β 2-microglobulin, respectively (Rohde et al., 2012; Zúñiga et al., 1999). Thus, the VSV matrix protein could participate in the retention of MHC-I molecules within the infected cells while the mutated protein may lack this ability. MHC-I upregulation at the tumor cell surface following M_{M51R} treatment likely explains the significantly improved CD8⁺ T cell dependent survival despite the poor gp33-specific CTL response induced by this mutant. This may result from an improved antigen presentation of multiple B16 antigens thus diluting a specific (gp33) response. One other possible explanation could come from the fact that the gp33 epitope is restricted to both H-2D^b and H-2K^b in C57Bl/6 mice (Hudrisier et al., 1997). The overexpression by M_{M51R} may skew or alter MHC-I haplotype expression thus reducing gp33 presentation but still allowing for efficient presentation of endogenous cancer-related epitopes. More detailed analyses of the alteration in MHC-I expression induced following M_{M51R} infection will be required to further characterize this potential mechanism.

Altogether our results indicate that the induction of an antitumoral immune response is critical for efficient oncolytic virotherapy and that this can be achieved in different ways depending of the mutational status of a given virus. A better understanding of the mechanisms used by viruses to modulate the induction of the anti-tumoral immune response will prove extremely valuable for the design of more potent oncolytic viruses for clinical applications.

MATERIALS & METHODS

Cell lines and viruses

Mouse L929 fibroblasts, green monkey kidney Vero cells and human HepG2 hepatocarcinoma cells were obtained from the American Type Culture Collection and grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Murine B16 and B16gp33 melanoma cells were obtained from Dr. A. Ochsenbein (Bern, Switzerland). The B16gp33 cell (H2-D^b) were derived from B16.F10 cells transfected with a DNA minigene encoding the immunodominant CD8⁺ T cell epitope of the lymphocytic choriomeningitis virus (glycoprotein aa 33-41) (Prevost-Blondel et al., 1998). Cells were grown in DMEM (Life Technologies, Rockville, MD) supplemented with 10% fetal FBS and 200 µg/ml of G418 to select for retention of the gp33 minigene.

VSV G and M mutants (San Juan isolate of the Indiana serotype) were described previously (Francoeur et al., 1987; Janelle et al., 2011). All viruses were propagated and titrated by standard plaque assays of serially diluted samples on Vero cells.

***In vivo* studies**

All procedures were approved by the INRS Institutional Animal Care and Use Committee. To establish subcutaneous tumors, 5×10^5 B16 or B16gp33 cells in 100 µl PBS were injected into the flank of C57Bl/6 mice. They were infected locally at the tumor site with 5.0×10^8 PFU of WT or mutant VSV on day 7, 9 and 11. Mice were sacrificed 8 days following the first VSV injection for immune response analysis. For survival studies, mice were monitored at indicated time points and sacrificed when tumor burden exceeded 17 mm in diameter. For PD-1/PD-L1 blockade experiments, mice were infected as described above and treated i.p. either with anti-PD-1 antibody (clone RMP1-14; 250µg) or anti-PD-L1 antibody (clone 10F.9G2; 200µg) on day 6, 10 and 14. Control mice were injected with isotype control antibodies for each treatment groups (respectively clones 2A3 and LTF-2) (BioXCell, West Lebanon, NH). For the adoptive transfer experiment, splenocytes from control and treated mice were harvested at day 8 following the first VSV injection as described above. CD8⁺ T lymphocytes were isolated using a CD8 T cell enrichment kit (Stemcell, Vancouver, BC, Canada) and 5.0×10^6 cells were injected intravenously into naive

mice. Parental B16 cells were inoculated 24 hours later as described above and tumor growth was monitored.

Detection of infectious virus *in vivo*

Mice were injected into the flank with 5×10^5 B16 cells in 100 μ l PBS. A single VSV dose of 5.0×10^8 PFU was given intra-tumorally 7 days after inoculation and tumors were harvested 15 minutes after infection (day 0) or every other day. Tumors were weighted, homogenized and centrifuged to allow for the detection of virus in supernatants as determined by plaque assay on Vero cells as described previously (Desforages et al., 2001).

Neutralizing antibody titration

Serum samples from mice bearing B16 tumors treated with VSV were collected at the indicated time points and tested for neutralizing activity using a plaque reduction assay as described previously (Charan and Zinkernagel, 1986). Briefly, serial 2-fold dilutions of 1/40 prediluted serum samples were mixed with equal volumes of VSV (using the same mutant injected for the oncolytic treatment) containing 5×10^3 PFU, and incubated for 90 min at 37°C. A total of 100 μ l of this solution was transferred onto Vero cell monolayers in 96-well plates and incubated for 1 h at 37°C. Monolayers were overlaid with medium containing 1% methylcellulose, and incubated overnight at 37°C. Then the overlay was removed and the monolayer fixed and stained with 0.5% crystal violet dissolved in 5% formaldehyde, 50% ethanol, and 4.25% NaCl. The serum dilution reducing the number of plaques by 50% was taken as titer. To determine IgG titers, undiluted serum was treated with an equal volume of 280 mM 2-ME for 1 h at room temperature before samples were processed, as described above. For cross-neutralization analysis, serum samples were mixed with VSV WT and processed as above.

Flow cytometry

Spleen and tumors were recovered from mice and dissociated to achieve single-cell suspensions using a nylon 100 μ m cell strainer (BD Falcon). Cells were washed, resuspended in phosphate-buffered saline containing 1% bovine serum albumin and 0.1% sodium azide (FACS buffer), and incubated with directly conjugated primary antibodies for 30 minutes at

4 °C. Cells were then washed and resuspended in 200 µl FACS buffer containing 1% formaldehyde. Samples were acquired on a FACS Fortessa (BD Biosciences, San Diego, CA) and analyzed using the Flowjo software (Tree Star, Ashland, OR). Anti-CD45 PE/CF-594, anti-CD25 APC and anti-NKp46 Alexa 700 were purchased from BD Biosciences (San Diego, CA). Anti-PD-1 FITC, anti-CD4 APC/Cy7, anti-CD4 FITC, anti-CD8 PE/Cy7, anti-CD62L Alexa 700, anti-CD44 PercP/Cy5.5, anti-B220 APC/Cy7, anti-CD11b Pacific Blue, anti-Gr1 PE/Cy5, anti-CD11c FITC, anti-F4/80 APC, anti-PD-L1 Brilliant violet 421 and anti-CD86 PE were purchased from BioLegend (San Diego, CA). Purified anti-VSV-G from the monoclonal VSV-Indiana-specific IgG-secreting hybridoma VI10 (Kalinke et al., 1996) (kindly obtained from Dr. R.M. Zinkernagel) was coupled to Alexa fluor 647 fluorochrome using the Alexa Fluor 647 Protein Labeling Kit (Life Technologies, Burlington, ON).

Intracellular staining assay

For IFN- γ and TNF- α intracellular staining, single-cell suspensions were prepared from spleen harvested 8 days after the first viral injection. Cytokine production, in response to viral or tumor antigens was measured by incubation with peptides (VSV-N; RGYVYQGL 5 µg/ml, gp33; KAVYNFATM 1 µg/ml, TRP-2; VYDFFVWL 5 µg/ml and gp100; EGSRNQDWL 5 µg/ml) in the presence of brefeldin A (10 µg/ml) and IL-2 (100 U/ml) for 5 hours. Cells were stained for surface markers, then fixed, and permeabilized for intracellular staining using fixation and permeabilization buffers from BioLegend (San Diego, CA) according to the manufacturer's instructions. For granzyme B intracellular staining, cells were incubated with peptides in the presence of monensin A (20 µg/ml) and anti-CD107a FITC antibody for 5 hours. Cells were stained for surface markers, then fixed and permeabilized for intracellular staining. IFN- γ PE and TNF- α APC were obtained from BioLegend (San Diego, CA) and granzyme B eFluor 450 was purchased from eBiosciences (San Diego, CA).

***In vitro* infections**

B16gp33, HepG2, L929 and Vero cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 10 or mock-infected. At 24h post-infection, cells were trypsinized, harvested, washed and resuspended in FACS buffer. Cells were labeled with anti-PD-1 FITC, anti-PD-L1 brilliant violet 421 and anti-H2 PE (BioLegend, San Diego, CA) and analyzed by flow

cytometry using a FACS Fortessa instrument (BD Biosciences) and the FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

Tumor surface molecules staining

Mice were injected into the flank with 5×10^5 B16gp33 cells in 100 μ l PBS. A single VSV dose was given intra-tumorally 7 days after inoculation and tumors were harvested 24 hours later. Tumors were then dissociated to achieve single-cell suspensions using a nylon 100 μ m cell strainer (BD Falcon), washed and resuspended in FACS buffer. Cells were labeled with anti-CD45 PE/CF594, anti-PD-1 FITC, anti-PD-L1 brilliant violet 421 and anti-H-2 PE (BioLegend, San Diego, CA) and analyzed by flow cytometry using a FACS Fortessa instrument (BD Biosciences) and the FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

MHC-I recognition assay

Mice were injected into the flank with 5×10^5 B16gp33 cells in 100 μ l PBS. A single VSV dose was given intra-tumorally 7 days after inoculation and tumors were harvested at 24 hours later. Tumors were then dissociated to achieve single-cell suspensions using a nylon 100 μ m cell strainer (BD Falcon), washed and coincubated with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester-labeled P14 transgenic splenocytes (gp33-41 specific T cells) at a 1:1 ratio in the presence of monensin A (20 μ g/ml) and APC-coupled anti-CD107a antibody for 5 hours. Cells were stained for surface markers and analyzed by flow cytometry using a FACS Fortessa instrument (BD Biosciences) and the FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

Statistical analyses

ANOVA with Tukey post-hoc testing was used for group comparisons and a Student T test was used for pair comparisons. P values of less than 0.05 were considered significant. Survival curves were plotted according the Kaplan–Meier method, and statistical significance in the different treatment groups was compared using the log-rank test.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Jeanne and J.-Louis Lévesque Chair in Immunovirology to A.L. from the J.-Louis Lévesque Foundation. V.J. and M.-P.L. acknowledge studentship support from the Fondation Armand-Frappier. P.L. holds a Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQS) postdoctoral award and a Thomas F. Nealon, III Postdoctoral Research Fellowship from the American Liver foundation.

REFERENCES

- Ahmed, M., Puckett, S., and Lyles, D.S. (2010). Susceptibility of breast cancer cells to an oncolytic matrix (M) protein mutant of vesicular stomatitis virus. *Cancer Gene Ther.* *17*, 883-892.
- Bloom, M.B., Perry-Lalley, D., Robbins, P.F., Li, Y., El-Gamil, M., Rosenberg, S.A., and Yang, J.C. (1997). Identification of tyrosinase-related protein 2 as a tumor rejection antigen for the B16 melanoma. *The Journal of Experimental Medicine* *185*, 453-460.
- Brutkiewicz, R.R., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., and Bendelac, A. (1995). TAP-independent, beta 2-microglobulin-dependent surface expression of functional mouse CD1.1. *The Journal of Experimental Medicine* *182*, 1913-1919.
- Calabi, F., and Bradbury, A. (1991). The CD1 system. *Tissue Antigens* *37*, 1-9.
- Chang, G., Xu, S., Watanabe, M., Jayakar, H.R., Whitt, M.A., and Gingrich, J.R. (2010). Enhanced oncolytic activity of vesicular stomatitis virus encoding SV5-F protein against prostate cancer. *J. Urol.* *183*, 1611-1618.
- Charan, S., and Zinkernagel, R.M. (1986). Antibody mediated suppression of secondary IgM response in nude mice against vesicular stomatitis virus. *The Journal of Immunology* *136*, 3057-3061.
- Desforges, M., Charron, J., Bérard, S., Beausoleil, S., Stojdl, D.F., Despars, G., Laverdière, B., Bell, J.C., Talbot, P.J., Stanners, C.P., and Poliquin, L. (2001). Different host-cell shutoff strategies related to the matrix protein lead to persistence of vesicular stomatitis virus mutants on fibroblast cells. *Virus Res.* *76*, 87-102.
- Diaz, R.M., Galivo, F., Kottke, T., Wongthida, P., Qiao, J., Thompson, J., Valdes, M., Barber, G., and Vile, R.G. (2007). Oncolytic Immunovirotherapy for Melanoma Using Vesicular Stomatitis Virus. *Cancer Res.* *67*, 2840-2848.
- Fernandez, M., Porosnicu, M., Markovic, D., and Barber, G.N. (2002). Genetically Engineered Vesicular Stomatitis Virus in Gene Therapy: Application for Treatment of Malignant Disease. *J. Virol.* *76*, 895-904.
- Francoeur, M.A., Poliquin, L., and Stanners, C.P. (1987). The Isolation of Interferon-Inducing Mutants of Vesicular Stomatitis Virus with Altered Viral P Function for the Inhibition of Total Protein Synthesis. *Virology* *160*, 236-245.

- Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 162-174.
- Galanis, E., Hartmann, L.C., Cliby, W.A., Long, H.J., Peethambaram, P.P., Barrette, B.A., Kaur, J.S., Haluska, P.J., Aderca, I., Zollman, P.J., *et al.* (2010). Phase I Trial of Intraperitoneal Administration of an Oncolytic Measles Virus Strain Engineered to Express Carcinoembryonic Antigen for Recurrent Ovarian Cancer. *Cancer Res.* *70*, 875-882.
- Galivo, F., Diaz, R.M., Wongthida, P., Thompson, J., Kottke, T., Barber, G., Melcher, A., and Vile, R. (2009). Single-cycle viral gene expression, rather than progressive replication and oncolysis, is required for VSV therapy of B16 melanoma. *Gene Ther.* *17*, 158-170.
- Heo, J., Reid, T., Ruo, L., Breitbach, C.J., Rose, S., Bloomston, M., Cho, M., Lim, H.Y., Chung, H.C., Kim, C.W., *et al.* (2013a). Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer. *Nat. Med.* *19*, 329-336.
- Heo, J., Reid, T., Ruo, L., Breitbach, C.J., Rose, S., Bloomston, M., Cho, M., Lim, H.Y., Chung, H.C., Kim, C.W., *et al.* (2013b). Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer. *Nat. Med.*
- Huang, T.G., Ebert, O., Shinozaki, K., Garcia-Sastre, A., and Woo, S.L. (2003). Oncolysis of hepatic metastasis of colorectal cancer by recombinant vesicular stomatitis virus in immune-competent mice. *Mol. Ther.* *8*, 434-440.
- Hudrisier, D., Oldstone, M.B.A., and Gairin, J.E. (1997). The Signal Sequence of Lymphocytic Choriomeningitis Virus Contains an Immunodominant Cytotoxic T Cell Epitope That Is Restricted by both H-2Db and H-2Kb Molecules. *Virology* *234*, 62-73.
- Janelle, V., Brassard, F., Lapierre, P., Lamarre, A., and Poliquin, L. (2011). Mutations in the glycoprotein of Vesicular Stomatitis Virus affect cytopathogenicity: Potential for oncolytic virotherapy. *J. Virol.* *85*, 6513-6520.
- Janelle, V., Poliquin, L., and Lamarre, A. (2013). Le virus de la stomatite vésiculaire dans la lutte contre le cancer. *Med Sci (Paris)* *29*, 175-182.
- Kalinke, U., Bucher, E.M., Ernst, B., Oxenius, A., Roost, H.-P., Geley, S., Kofler, R., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1996). The Role of Somatic Mutation in the

- Generation of the Protective Humoral Immune Response against Vesicular Stomatitis Virus. *Immunity* 5, 639-652.
- Leveille, S., Goulet, M.L., Lichty, B.D., and Hiscott, J. (2011). Vesicular stomatitis virus oncolytic treatment interferes with tumor-associated dendritic cell functions and abrogates tumor antigen presentation. *J. Virol.* 85, 12160-12169.
- Naik, S., and Russell, S.J. (2009). Engineering oncolytic viruses to exploit tumor specific defects in innate immune signaling pathways. *Expert Opin. Biol. Ther.* 9, 1163-1176.
- Nguyên, T.L.-A., Abdelbary, H., Arguello, M., Breitbach, C., Leveille, S., Diallo, J.-S., Yasmeen, A., Bismar, T.A., Kirn, D., Falls, T., *et al.* (2008). Chemical targeting of the innate antiviral response by histone deacetylase inhibitors renders refractory cancers sensitive to viral oncolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 14981-14986.
- Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G.M., Apetoh, L., Perfettini, J.-L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., *et al.* (2007). Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* 13, 54-61.
- Okazaki, T., and Honjo, T. (2007). PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int. Immunol.* 19, 813-824.
- Ozduman, K., Wollmann, G., Piepmeyer, J.M., and Van den Pol, A.N. (2008). Systemic vesicular stomatitis virus selectively destroys multifocal glioma and metastatic carcinoma in brain. *J. Neurosci.* 28, 1882-1893.
- Parkhurst, M.R., Fitzgerald, E.B., Southwood, S., Sette, A., Rosenberg, S.A., and Kawakami, Y. (1998). Identification of a Shared HLA-A*0201-restricted T-Cell Epitope from the Melanoma Antigen Tyrosinase-related Protein 2 (TRP2). *Cancer Res.* 58, 4895-4901.
- Parry, R.V., Chemnitz, J.M., Frauwirth, K.A., Lanfranco, A.R., Braunstein, I., Kobayashi, S.V., Linsley, P.S., Thompson, C.B., and Riley, J.L. (2005). CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* 25, 9543-9553.
- Prestwich, R.J., Ilett, E.J., Errington, F., Diaz, R.M., Steele, L.P., Kottke, T., Thompson, J., Galivo, F., Harrington, K.J., Pandha, H.S., *et al.* (2009). Immune-mediated antitumor activity of Reovirus is required for therapy and is independent of direct viral oncolysis and replication. *Clin. Cancer Res.* 15, 4374-4381.

- Prevost-Blondel, A., Zimmermann, C., Stemmer, C., Kulmburg, P., Rosenthal, F.M., and Pircher, H. (1998). Tumor-infiltrating lymphocytes exhibiting high ex vivo cytolytic activity fail to prevent murine melanoma tumor growth in vivo. *J. Immunol.* *161*, 2187-2194.
- Reid, T., Galanis, E., Abbruzzese, J., Sze, D., Wein, L.M., Andrews, J., Randlev, B., Heise, C., Uprichard, M., Hatfield, M., *et al.* (2002). Hepatic Arterial Infusion of a Replication-selective Oncolytic Adenovirus (dl1520): Phase II Viral, Immunologic, and Clinical Endpoints. *Cancer Res.* *62*, 6070-6079.
- Renukaradhya, G.J., Khan, M.A., Shaji, D., and Brutkiewicz, R.R. (2008). Vesicular stomatitis virus matrix protein impairs CD1d-mediated antigen presentation through activation of the p38 MAPK pathway. *J. Virol.* *82*, 12535-12542.
- Rohde, J., Emschermann, F., Knittler, M., and Rziha, H.-J. (2012). Orf virus interferes with MHC class I surface expression by targeting vesicular transport and Golgi. *BMC Vet. Res.* *8*, 114.
- Rommelfanger, D.M., Offord, C.P., Dev, J., Bajzer, Z., Vile, R.G., and Dingli, D. (2012). Dynamics of melanoma tumor therapy with vesicular stomatitis virus: explaining the variability in outcomes using mathematical modeling. *Gene Ther.* *19*, 543-549.
- Speiser, D.E. (2012). A molecular profile of T-cell exhaustion in cancer. *OncolImmunology* *1*, 369-371.
- Stojdl, D.F., Lichty, B., Knowles, S., Marius, R., Atkins, H., Sonenberg, N., and Bell, J.C. (2000). Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat. Med.* *6*, 821-825.
- Toda, M., Rabkin, S.D., Kojima, H., and Martuza, R.L. (1999). Herpes simplex virus as an in situ cancer vaccine for the induction of specific anti-tumor immunity. *Hum. Gene Ther.* *10*, 385-393.
- Vandepol, S.B., Lefrancois, L., and Holland, J.J. (1986). Sequences of the major antibody binding epitopes of the Indiana serotype of vesicular stomatitis virus. *Virology* *148*, 312-325.
- Wongthida, P., Diaz, R.M., Galivo, F., Kottke, T., Thompson, J., Pulido, J., Pavelko, K., Pease, L., Melcher, A., and Vile, R. (2010). Type III IFN interleukin-28 mediates the

antitumor efficacy of oncolytic virus VSV in immune-competent mouse models of cancer. *Cancer Res.* 70, 4539-4549.

Wongthida, P., Diaz, R.M., Pulido, C., Rommelfanger, D., Galivo, F., Kaluza, K., Kottke, T., Thompson, J., Melcher, A., and Vile, R. (2011). Activating systemic T-cell immunity against self tumor antigens to support oncolytic virotherapy with vesicular stomatitis virus. *Hum. Gene Ther.* 22, 1343-1353.

Zúñiga, M.C., Wang, H., Barry, M., and McFadden, G. (1999). Endosomal/Lysosomal Retention and Degradation of Major Histocompatibility Complex Class I Molecules Is Induced by Myxoma Virus. *Virology* 261, 180-192.

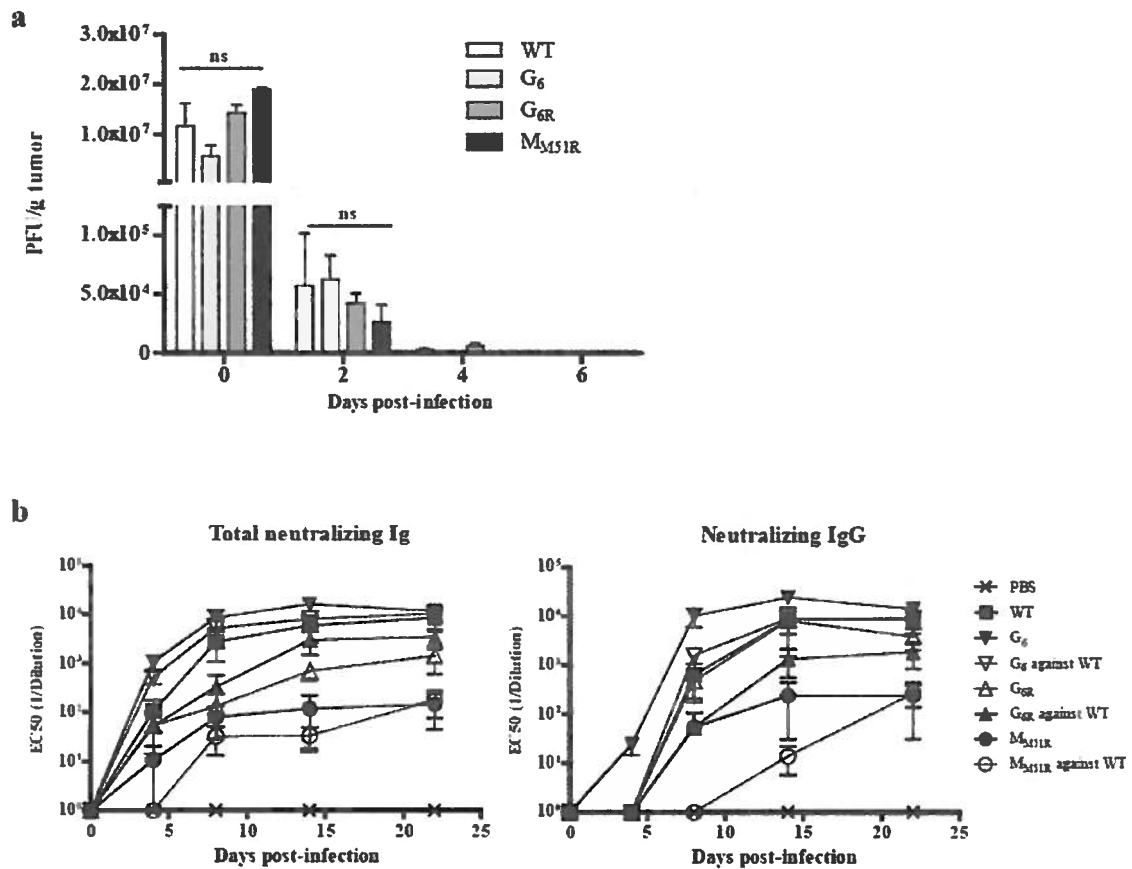


Figure 1: Characteristics of VSV infections in B16 melanoma tumors. (a) C57Bl/6 mice (n=3 mice per group per time point) were injected subcutaneously with B16 cells and infected with a single intratumoral dose of either VSV WT or the mutants with 5×10^8 PFU on day 7, harvested right after injection and on indicated days post-infection. Virus titers were assayed using standard plaque assay. Data are the mean \pm SEM of three tumors. (b) C57Bl/6 mice (n=6) were injected subcutaneously with B16 cells and infected locally at tumor site with 5.0×10^8 PFU of WT or mutant VSV on day 7, 9 and 11. Sera from the indicated days after infection were tested for total neutralizing immunoglobulins and IgGs using a plaque reduction assay. Indicated data points represent serum dilutions that reduced plaque formation by 50%. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments.

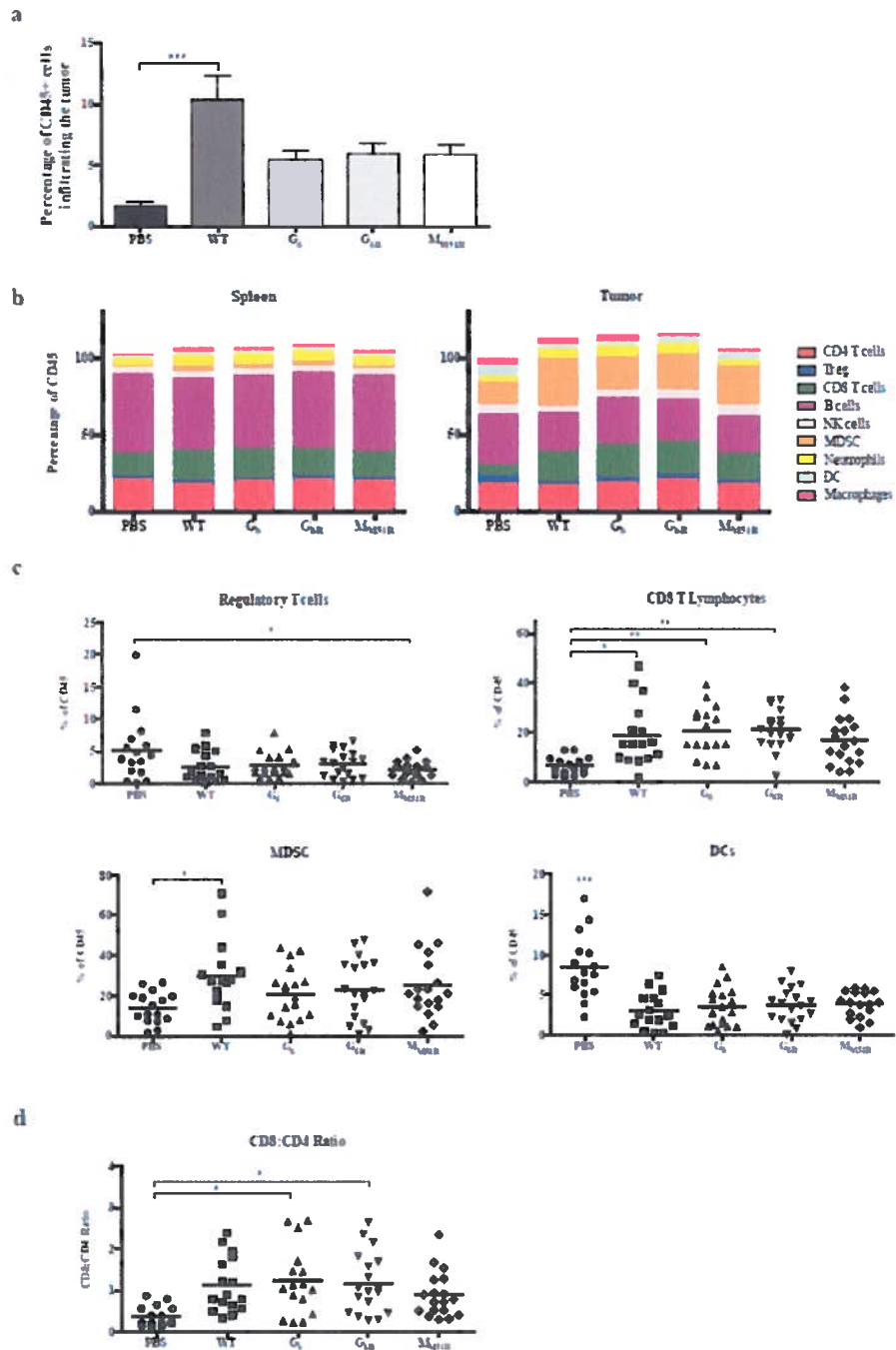


Figure 2: Tumor infiltration of immune cells following VSV treatment. C57Bl/6 mice (n=9) were injected subcutaneously with B16gp33 cells and infected locally at the tumor site with 5.0×10^8 PFU of WT or mutant VSV on day 7, 9 and 11. On day 8 following the first

VSV dose, tumor and spleen were harvested and immune cell subpopulations were determined by flow cytometry. Mean \pm SEM of three independent experiments showing total tumor infiltrating CD45⁺ cells (a) and subpopulations proportions of CD4 T cells (CD4⁺CD25⁻), regulatory T cells (CD4⁺CD25⁺), CD8 T cells, B cells (B220⁺), NK cells (NKp46⁺), MDSC (Gr1⁺CD11b⁺), Neutrophils (Gr1⁺CD11b⁻), dendritic cells (Gr1⁻CD11b⁺CD11c⁺) and macrophages (Gr1⁻CD11b⁺F4/80⁺) were measured in the spleen and tumor tissue (b). Separate percentages of Tregs, CD8⁺ T cells, MDSC and DCs (c) as well as CD8/CD4 ratio (d) are also shown. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

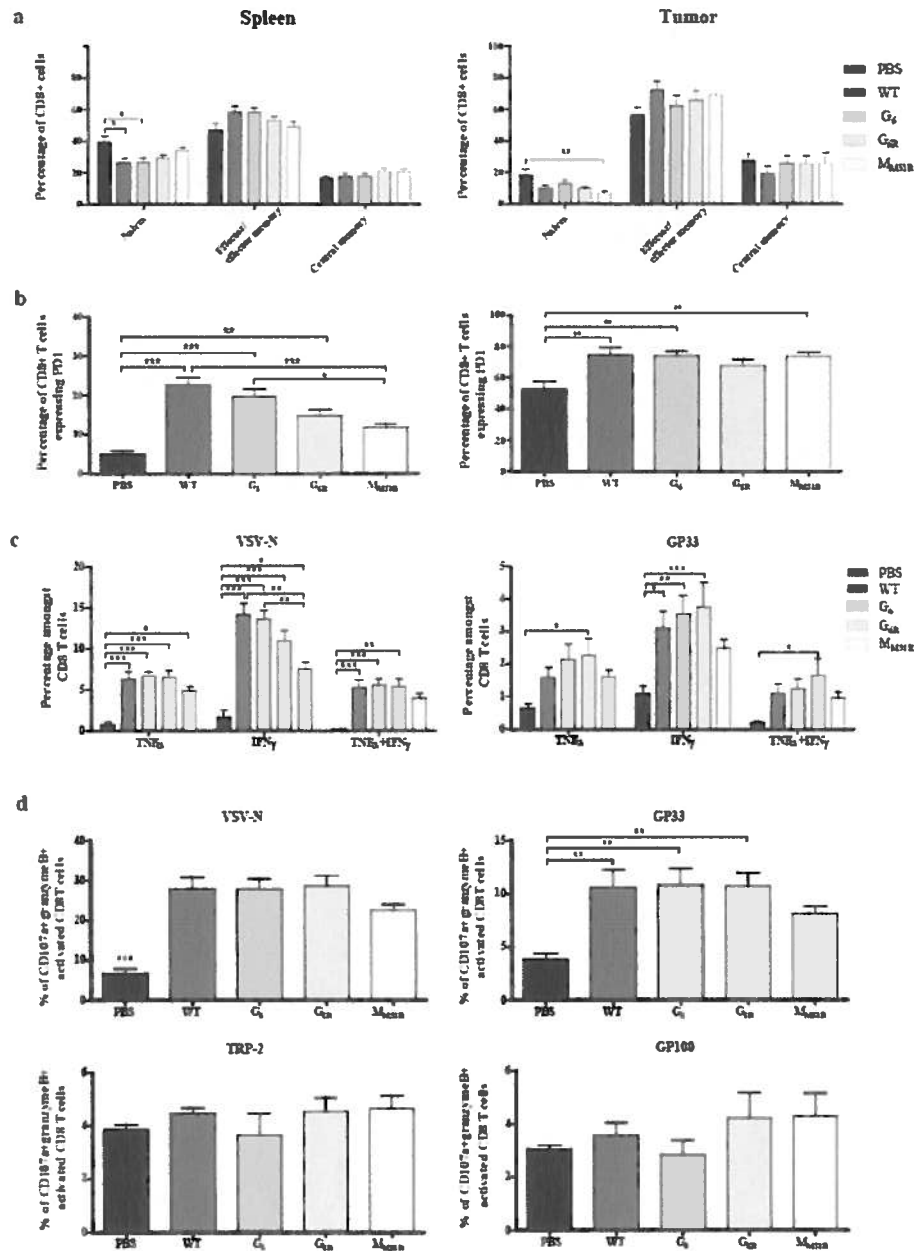


Figure 3: Immune response induced following VSV treatments. B16gp33-bearing mice (n=9) were infected locally at the tumor site with 5.0×10^8 PFU of WT or mutant VSV on day 7, 9 and 11. On day 8 following the first VSV dose, tumor and spleen were harvested and

the activation profile was analyzed by flow cytometry using. (a) Naïve (CD62L⁺CD44⁻), effector/effector memory (CD62L⁻) and central memory T cells (CD62L⁺CD44⁺) as well as (b) PD-1 expression on T cells in tumor and spleen after VSV treatments are shown. Data are the mean \pm SEM of three independent experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001. (c) B16gp33-bearing mice (n=9) were infected locally at the tumor site with 5.0×10^8 PFU of WT or mutant VSV on day 7, 9 and 11. On day 8 following the first VSV dose, splenocytes were isolated and stimulated *ex vivo* with VSV-N (RGYVYQGL) or gp33 (KAVYNFATC) peptides to analyze cytokines secretion and (d) VSV-N (RGYVYQGL), gp33 (KAVYNFATC), TRP-2 (VYDFFVWL) or gp100 (EGSRNQDWL) peptides for degranulation assay. Data are the mean \pm SEM of three independent experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.

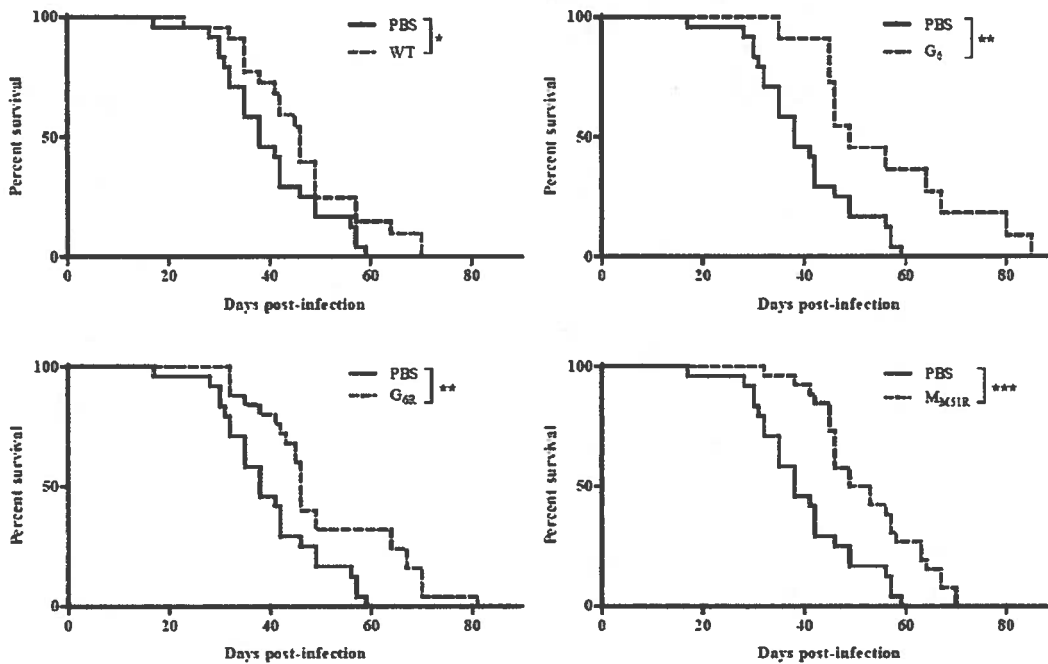


Figure 4: VSV therapy in the B16 tumor model. C57Bl/6 mice (n=11-26) were injected subcutaneously with B16 cells and infected locally at the tumor site with 5.0×10^8 PFU of WT or mutant VSV on day 7, 9 and 11. Survival (tumors < 1.7 cm in any diameter) is shown (a) as well as the percentage of mice with definite tumor areas at indicated time points (b). Data show three combined independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

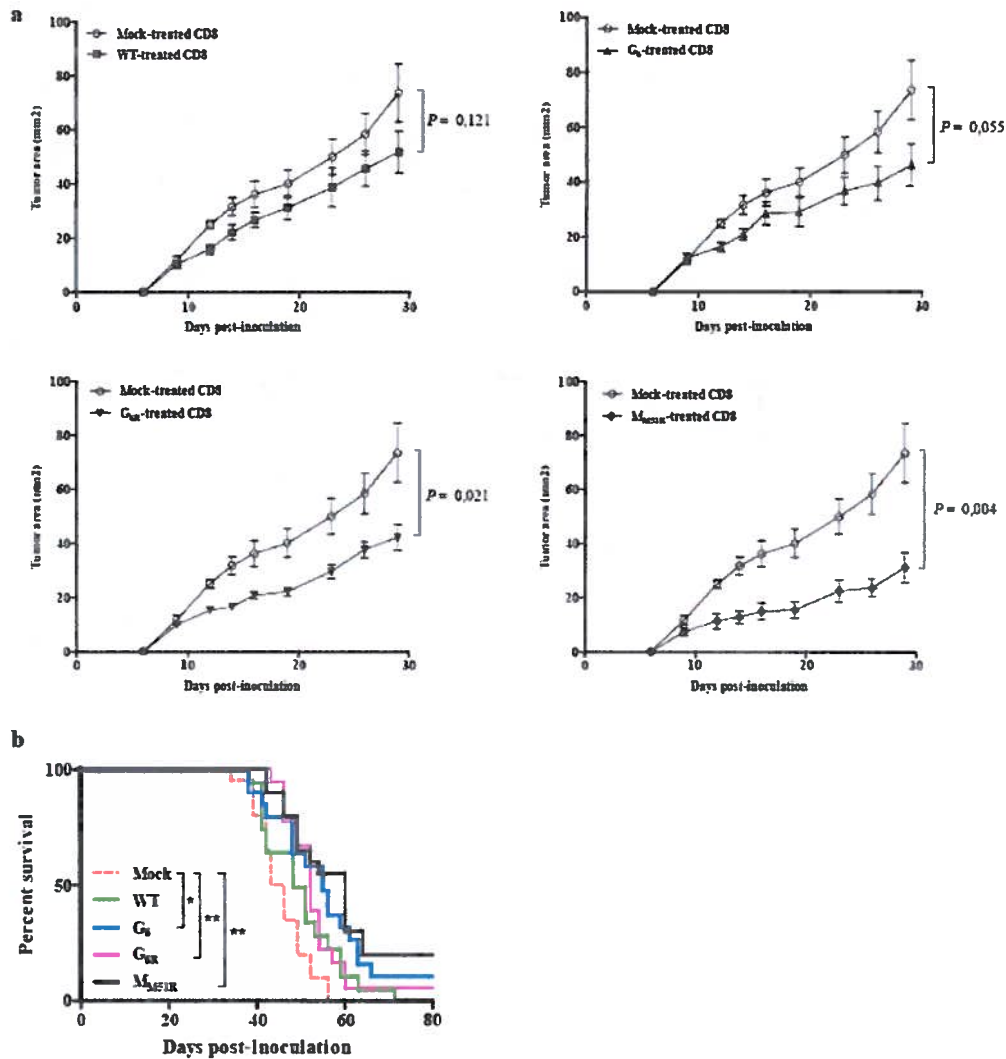


Figure 5: Adoptive transfer of activated CD8⁺ T lymphocytes limits tumor progression. B16gp33-bearing mice (n=10) were infected locally at the tumor site with 5.0×10^8 PFU of WT, mutant VSV or mock infected on day 7, 9 and 11. On day 8 following the first VSV dose, the spleen was harvested and CD8⁺ T cells purified. 5.0×10^6 cells were transferred intravenously into naive recipients 24 hours prior to parental B16 inoculation and tumor growth was measured (a). Data represents the mean \pm SEM and is representative of two independent experiments. Overall survival (n=20) was also assessed (b) and data are from two independent experiments combined. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

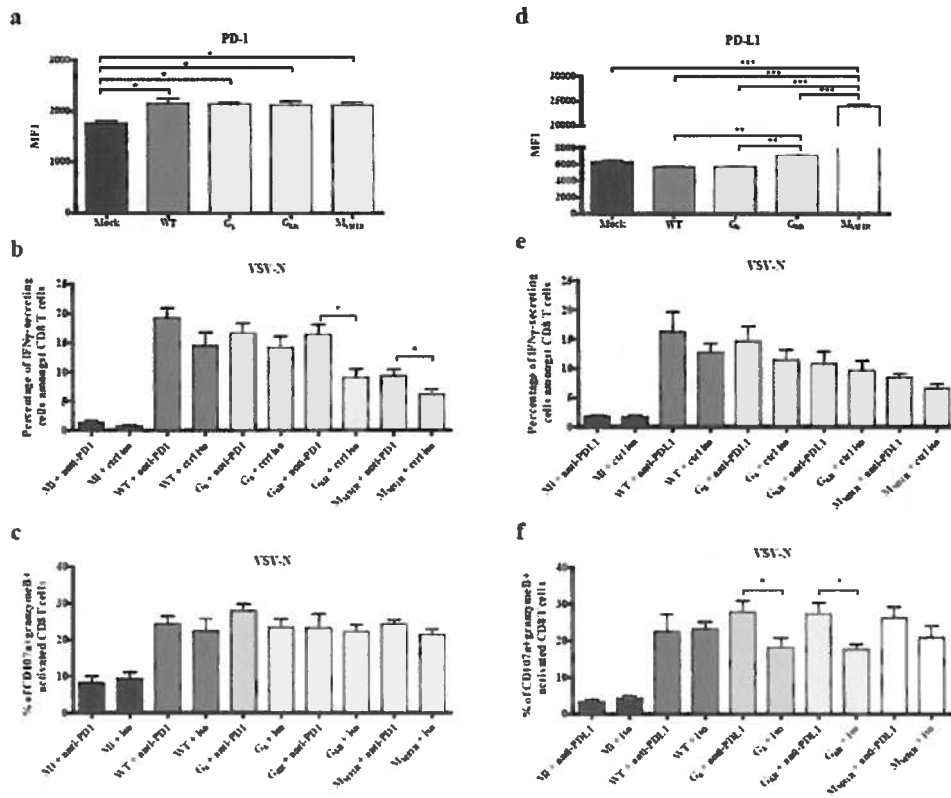


Figure 6: Expression of PD-1 and PD-L1 on B16gp33 cells following VSV infection. B16gp33 cells were infected at an MOI of 10 or mock-infected. At 24 hours post-infection, cells were labeled to measure (a) PD-1 and (d) PD-L1 expression by flow cytometry. Data are the mean ± SEM and representative of two independent experiments in triplicates. B16gp33-bearing mice (n= 6-9) were also infected locally at the tumor site with 5.0×10^8 PFU of WT or mutant VSV on day 7, 9 and 11 and treated either with (b,c) anti-PD-1 (250µg), (e,f) anti-PD-L1 (200µg) or isotype control antibodies on day 6, 10 and 14. On day 8 following the first VSV dose, splenocytes were isolated and stimulated *ex vivo* with VSV-N (RGYVYQGL) or gp33 (KAVYNFATC) peptides to analyze cytokines secretion. Data show the combination of three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

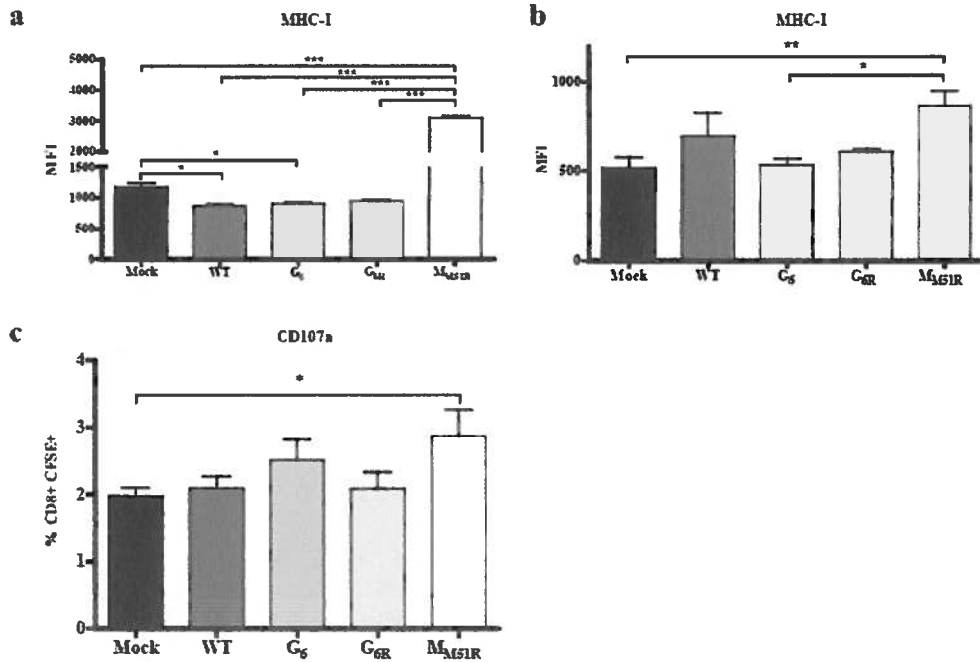


Figure 7: Expression of MHC-I on B16gp33 cells following VSV infection. (a) B16gp33 cells were infected at an MOI of 10 or mock-infected. At 24 hours post-infection, cells were labeled to measure MHC-I expression by flow cytometry. Data are the mean \pm SEM and representative of two independent experiments in triplicates. (b) B16gp33-bearing mice (n= 4-5) were also infected locally at the tumor site with 5.0×10^8 PFU of WT or mutant VSV on day 7. The following day, tumors were isolated and (b) labeled for the detection of MHC-I expression on CD45⁻ cells or (c) cocultured with CFSE-labeled P14 transgenic splenocytes to analyze degranulation efficacy of CD8⁺CFSE⁺ cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

3. Influence du système du complément dans le contrôle tumoral.

Dans l'optique d'améliorer la thérapie par VSV, nous avons émis l'hypothèse que l'inhibition transitoire du système du complément pourrait permettre une plus grande fenêtre d'action du virus. En effet, le complément est reconnu pour efficacement neutraliser les particules virales circulantes (Beebe and Cooper, 1981; Mills et al., 1979). En limitant l'interaction des protéines du complément à l'aide de facteur de venin de cobra (CVF) pendant l'administration intratumorale du VSV, nous pensions que ce dernier pourrait être mieux distribué aux cellules tumorales et mener à une lyse plus efficace. De façon concomitante, nous pensions que ceci pourrait rendre plus d'antigènes tumoraux disponibles à l'apprêtement et la présentation par les cellules présentatrices d'antigènes et ainsi générer une meilleure réponse immunitaire spécifique à la tumeur. Toutefois, nous avons déterminé que cette inhibition transitoire du complément n'améliore pas le traitement oncolytique. Cependant, de façon inattendue, il est apparu que l'administration de CVF seul permet la génération d'une réponse antitumorale augmentée contrairement aux animaux non traités. C'est à partir de cette découverte que nous avons décidé d'approfondir les mécanismes immunitaires impliqués dans l'induction de cette réponse.

Cet article traite donc de l'effet de l'injection d'une dose de CVF à des souris porteuses du mélanome B16 sur le recrutement de cellules au site tumoral et du statut d'activation, de fonctionnalité et de cytotoxicité des lymphocytes T CD8⁺ antitumoraux. Il démontre également que la génération de cette réponse immunitaire spécifique est dépendante des cellules NK, illustrant un lien direct entre le complément et ce type cellulaire.

3.1 Article 4. « Transient complement inhibition promotes a tumor-specific immune response through the implication of natural killer cells. » (*Cancer Immunol Res.* 2013; 10.1158/2326-6066.CIR-13-0173).

Contribution des différents auteurs

VJ : Conception de l'étude, expérimentations (sauf figure supplémentaire 1) et rédaction de l'article

MPL : Expérimentations : cinétique de décomplémentation (Figure supplémentaire 1)

ET : Culture des hybridomes et génération des anticorps PK136

PL : Aide aux expérimentations (traitement des organes de souris), lecture et commentaires aidant la rédaction de l'article

AL : Supervision et rédaction de l'article

LP : Supervision et rédaction de l'article

**TRANSIENT COMPLEMENT INHIBITION PROMOTES A TUMOR-SPECIFIC
IMMUNE RESPONSE THROUGH THE IMPLICATION
OF NATURAL KILLER CELLS.**

Valérie Janelle^{1,2}, Marie-Pierre Langlois¹, Esther Tarrab¹, Pascal Lapierre¹, Laurent Poliquin²
and Alain Lamarre^{1,2}

Affiliations : ¹ Immunovirology laboratory, Institut national de la recherche scientifique,
INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada

² Biomed Research Center, Department of Biology, Université du Québec à
Montréal, Montréal, Québec, Canada

Correspondance to : A. Lamarre: Immunovirology Laboratory,
Institut national de la recherche scientifique,
INRS-Institut Armand-Frappier,
Laval, Québec, Canada, H7V 1B7
Phone: 450-687-5010 ext: 4262,
Fax: 450-686-5501,
E-mail: alain.lamarre@iaf.inrs.ca

Running title : Anti-tumor immune response induced by decompementation

ABSTRACT

While the role of the complement system in cancer development has been studied, its involvement in the development of an anti-tumoral immune response remains poorly understood. Using cobra venom factor to inhibit the complement cascade via C3 molecule exhaustion in immunocompetent mice bearing B16gp33 melanoma tumors, we show that transient inhibition of the complement system allowed for the development of a more robust gp33-specific anti-tumoral CD8⁺ T cell response. This immune response proved to be NK-dependent suggesting an interaction of complement proteins with this cellular subset leading to T lymphocyte activation and enhanced cytotoxic T cell activity against tumor cells. This study demonstrates for the first time the implication of the complement system in the development of NK-mediated cytotoxic T cell-dependent anti-tumoral immune responses. The complement pathway could therefore be a potent therapeutic target in cancer patients to improve NK-dependent anti-tumoral immune responses.

INTRODUCTION

Historically, the complement system has been considered a ‘complementing’ player in the innate immune response that mediated clearance of various pathogens or dead cells and could induce inflammation (Ricklin and Lambris, 2007). In cancer, activated complement proteins were primarily described for their role in tumor defense either through complement-dependent cytotoxicity (Ostrand-Rosenberg, 2008a) or antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (Gelderman et al., 2004). However, the complement anaphylatoxins C3a and C5a can increase the activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), Akt and mammalian target of rapamycin (mTOR) (Venkatesha et al., 2005), proteins strongly associated with neoplasia when overexpressed, suggesting a more complex role for complement proteins in tumorigenicity. Furthermore, mice deficient in C3 or C4 show significantly decreased TC-I subcutaneous tumor proliferation compared with wild-type mice (Markiewski et al., 2008) while the C5a protein can be involved in CD8⁺ T cell inhibition (Rutkowski et al., 2010c).

NK cells are large granular lymphocytes part of the innate immune system implicated in host defense against tumors and pathogens (Moretta et al., 2002). NK cells express FcγR, which interacts with immunoglobulin bound to antigen on target cells, leading to NK cell activation (Arase et al., 1997) and production of IFNγ and TNFα (Roda et al., 2006). NK cells can also complement cytotoxic T lymphocytes (CTLs) by killing MHC-I-deficient cells that failed to be recognized by T cells (Moretta et al., 2002). NK cells have been shown to cross-talk with dendritic cells (DCs); their effector functions being stimulated through direct contact with activated DCs (Fernandez et al., 1999). However, DC/NK-cell interactions are bi-directional, resulting not only in NK-cell activation but also DC maturation depending on the activation status of both cells (Vitale et al., 2005). Soluble factors such as TNFα and IFNγ, as well as cell-to-cell contact, are required for NK-mediated DC activation (Piccioli et al., 2002).

Little is known about the link between complement and NK cells but evidence suggests that complement receptor CR3, a receptor implicated in phagocytosis mediated by complement fragment iC3b-opsonized targets (Caron and Hall, 1998), is expressed by NK

cells and cytotoxic T cells displaying similar functions as CR3 expressed on phagocytes (Muto et al., 1993). Given that NK cells can be involved in tumor control and that proteins from the complement pathway may interact with NK cells to suppress or limit their functions, we hypothesized that proteins in the complement pathway may favor tumor growth through the impediment of NK cells. Herein, we found that transient inhibition of complement increased NK cell numbers in spleen and tumor leading to the induction of an increased anti-tumoral CTL response.

MATERIAL & METHODS

Cell lines

Murine B16 and B16gp33 melanoma cells were obtained from Dr. A. Ochsenbein (Bern, Switzerland). The B16gp33 cell (H2-D^b) were derived from B16.F10 cells transfected with a DNA minigene encoding the immunodominant CD8⁺ T cell epitope of the lymphocytic choriomeningitis virus (glycoprotein aa 33-41) (Prevost-Blondel et al., 1998). Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies, Rockville, MD) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 200 µg/ml of G418 to select for retention of the gp33 minigene.

Enzyme-linked immunosorbent assay

C3 molecule concentration was tested in mice sera at the indicated time points by ELISA. Briefly, blood was harvested and incubated at 37°C to coagulate. Samples were centrifuged and the serum fraction was used. Serial dilutions were added onto an IgM-coated 96-well plate (5µg/ml; Sigma-Aldrich, Oakville, ON). Mouse anti-C3 coupled to biotin (Cedarlane, Burlington, ON) followed with streptavidin-horseradish peroxidase (Southern Biotech, Birmingham, AL) were incubated with samples. A solution of *o*-Phenylenediamine dihydrochloride (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) was then used for the detection of C3 molecules. Optical density was measured by spectrophotometry at 490 nm.

***In vivo* studies**

All procedures were approved by the INRS Institutional Animal Care and Use Committee. To establish subcutaneous tumors, 5×10^5 B16 or B16gp33 cells in 100 µl PBS were injected into the flank of C57Bl/6 mice. Six days after tumor implantation, mice were injected with cobra venom factor (CVF; 20 µg/mouse; Quidel, Santa Clara, CA) intraperitoneally. For NK depletion experiments, 200 µg of purified monoclonal anti-NK1.1 antibodies from PK136 hybridoma, kindly provided by Dr. Suzanne Lemieux (Laval, Canada), were injected intraperitoneally two days prior to deplementation (Fig. S2).

Flow cytometry

Spleen and tumors were recovered from mice and dissociated *in vitro* to achieve single-cell suspensions using nylon 100 µm cell strainers (BD Falcon). Cells were washed, resuspended in phosphate-buffered saline containing 1% bovine serum albumin and 0.1% sodium azide (FACS buffer), and incubated with directly conjugated primary antibodies for 30 minutes at 4°C. Cells were then washed and resuspended in 200 µl FACS buffer containing 1% paraformaldehyde. Samples were acquired on a FACS Fortessa (BD Biosciences, San Diego, CA) and analyzed using Flowjo software (Tree Star, Ashland, OR). Anti-CD45 PE/CF-594, anti-CD25 APC and anti-NKp46 Alexa 700 were purchased from BD Biosciences. Anti-CD4 APC/Cy7, anti-CD4 FITC, anti-CD8 PE/Cy7, anti-CD62L Alexa 700, anti-CD44 PercP/Cy5.5, anti-B220 APC/Cy7, anti-CD11b Pacific Blue, anti-Gr1 PE/Cy5, anti-CD11c FITC and anti-F4/80 APC were purchased from BioLegend (San Diego, CA).

Dendritic cell activation

Single-cell suspensions were prepared from spleen and draining lymph node harvested 9 days after CVF injection. Red blood cells were lysed and remaining cells were resuspended in FACS buffer prior to CD11c-FITC and CD86-PE labeling (BioLegend, San Diego, CA). Samples were acquired on a FACS Fortessa (BD Biosciences, San Diego, CA) and analyzed using Flowjo software (Tree Star, Ashland, OR).

NK intracellular staining assay

For IFN γ intracellular staining, single-cell suspensions were prepared from spleen and tumor harvested 9 days after CVF injection. Cells were cocultured with YAC-1 cells (provided by Dr. Suzanne Lemieux, Laval, Canada; at 10:1 effector-target ratio) with or without PMA-ionomycin. Cytokine production was measured in presence of monensin A (20 µg/ml), brefeldin A (10 µg/ml) and anti-CD107a FITC antibody for 5 hours. Cells were stained for surface markers, fixed, and permeabilized for intracellular staining using fixation and permeabilization buffers from BioLegend according to the manufacturer's instructions. IFN γ -PE and CD107a-FITC were obtained from BioLegend (San Diego, CA.)

T lymphocyte intracellular staining assay

For IFN γ and TNF α intracellular staining, single-cell suspensions were prepared from spleen (three mice per group) 9 days after CVF injection. Cytokine production in response to tumor antigen, was measured by incubation with the gp33 peptide (KAVYNFATC 1 μ g/ml) in the presence of brefeldin A (10 μ g/ml) and IL-2 (100 U/ml) for 5 hours. Cells were stained for surface markers then fixed, and permeabilized for intracellular staining using fixation and permeabilization buffers as described above. For degranulation assay and granzyme B intracellular staining, cells were incubated with the peptides in the presence of monensin A (20 μ g/ml) and anti-CD107a FITC antibody for 5 hours. Cells were stained for surface markers, then fixed, and permeabilized for intracellular staining. IFN γ -PE and TNF α -APC were obtained from BioLegend (San Diego, CA) and granzyme B eFluor 450 was purchased from eBiosciences (San Diego, CA).

Statistical analyses

A Student T test was used for group comparison and *P* values of less than 0.05 were considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

CVF-mediated de complementation slows down early tumor progression and promotes immune cell infiltration.

In recent years, there has been regained interest in the role of complement in various disease conditions. In cancer, the role of complement is unclear since it has been reported to play a role in both tumor clearance and progression (Gelderman et al., 2004; Ostrand-Rosenberg, 2008a). Nevertheless, studies have indicated that blocking complement proteins might improve the efficacy of anti-tumor immunotherapy (Macor and Tedesco, 2007). Some complement activation products, like the anaphylatoxins C3a and C5a, are potent proinflammatory mediators and it is now well recognized that inflammation is able to both promote and exacerbate tumor growth.

To establish the role of the complement system in the generation of an anti-tumoral immune response, transient de complementation was performed using cobra venom factor (CVF) 6 days following tumor administration, at the time when T cell priming is expected to occur. CVF is a structural and functional analog of the C3 molecule, which will act as a C3/C5 convertase. CVF-containing convertases are more stable and resistant to regulatory inhibitors and deplete complement activity by C3 consumption (Vogel et al., 1984). Unlike complement protein knockout mice (eg. C3^{-/-}, C4^{-/-} or C5^{-/-}), CVF does not affect splenic architecture thus allowing a complete and unaltered immune response to be mounted and analyzed (Marsh et al., 2001). Since CVF-mediated complement depletion lasts approximately three days in treated mice (Fig. S1), we hypothesized that this short period of time could affect T cell priming. CVF-mediated transitory de complementation soon after tumor implantation efficiently led to a significant slowdown of B16 melanoma tumor growth (Fig. 1A). Even if this was not associated with a significant increase in the percentage of tumor-infiltrating immune cells 9 days following de complementation (Fig. 1B), it modulated the composition of infiltrating cells. Strikingly, CVF treatment affected NK cell proportions, but had little to no effect on the proportions of CD4⁺ T cells, regulatory T cells, CD8⁺ T cells, B cells, neutrophils, macrophages and DCs (Fig. 1C).

An important mechanism used by malignancies to suppress immune responses against tumor antigens is abnormal myelopoiesis and the recruitment of myelomonocytic cells to the tumor microenvironment and peripheral lymphoid organs (Gallina et al., 2006). In concordance with the study by Markiewski *et al.* (Markiewski et al., 2008), complement inhibition also significantly decreased myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in tumor and spleen (Fig. 1C and Fig. S2). MDSC are a population of intermediately differentiated myeloid cells known to abolish cancer immunosurveillance therefore potentiating neoplastic proliferation (Ostrand-Rosenberg, 2008a). These cells express high levels of membrane C5aR (Markiewski et al., 2008). C5a/C5aR binding on MDSC promotes their migration and increases their production of immunosuppressive molecules such as reactive oxygen and nitrogen species, consequently inhibiting cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes and NK cells and stimulating tumorigenic cytokine production and angiogenesis (Mantovani et al., 2008; Markiewski et al., 2008). MDSC can also be recruited to tumors by anaphylatoxin C5a deposited in the tumor vasculature (Markiewski et al., 2008).

CVF treatment promotes a better NK cell availability.

NK cell proportions were greatly increased following de complementation both in the tumor (eight-fold) and in the spleen (three-fold) (Fig. 2A). We next wanted to assess whether de complementation also modulated NK cell function. Tumoral and splenic NK cells harvested 9 days after CVF treatment were not impaired functionally compared to non-treated animals, as determined by degranulation assay (CD107a) and IFN γ production after exposure to YAC-1 target cells. Furthermore, NK cells retained their ability to respond to *ex vivo* stimulation (Fig. 2B). Complement proteins are known to induce the production of transforming growth factor- β (TGF- β) (Gionanlis et al., 2008) which may facilitate angiogenesis, invasion and metastasis (Derynck et al., 2001) and downregulation of IL-2R β expression as well as IFN γ secretion by NK cells (Penafuerte and Galipeau, 2008). Our results suggest that it is unlikely that this pathway is involved here since NK cells harvested from CVF-treated mice are fully functional and respond normally.

The complement system limits systemic T cell activation.

It is well recognized that the clearance of apoptotic cells through iC3b opsonisation and CR3 phagocytosis can be accompanied by a reduction in the expression of co-stimulatory molecules and an impaired maturation of dendritic cells (Morelli et al., 2003). The recruitment of large numbers of NK cells may therefore be critical for optimal DC activation and subsequent induction of T cell responses in these low-inflammation conditions. Given that NK cells can cross-talk with DCs to mediate their activation, we wanted to assess their activation status after transient inhibition of the complement system. We did not observe any modulation of CD86 expression levels in splenic or draining lymph node DCs (Fig. 3A). We then sought to determine if the enhanced NK cell proportions at the tumor site could nevertheless lead to an increased T cell activation. The majority of CD4⁺ and CD8⁺ T cells present in the tumor were of the effector/effector memory phenotype and their proportions did not change following complement inhibition. However, in the spleen, CVF-mediated depletion of complement led to reduced proportions of naive T cells associated with increased proportions of effector CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Fig. 3B). It is therefore likely that, in the absence of complement proteins, functional DCs have access to more tumor antigens due to increased NK-mediated cell lysis allowing for a better presentation to CD8⁺ T lymphocytes.

The enhancement of tumor-specific CTL responses in decompemented mice is NK-dependent.

It has been reported that complement components can interfere with the binding of NK cells to monoclonal antibodies (mAbs) used in certain cancer treatments thus limiting NK cell-mediated lysis of antibody-coated target cells (Wang et al., 2008). It was also showed that this inhibition was dependent on C3b, likely by its binding to CR3 molecules abrogating signaling via Fcγ receptor III (CD16) (Wang et al., 2008). Furthermore, depletion of complement has been shown to enhance survival rates following mAb therapy in a syngeneic mouse model of lymphoma (Wang et al., 2009).

To ascertain if the enhanced tumor control we observed in decompemented mice was a direct consequence of the increased proportions of NK cells in these mice, we depleted NK

cells 4 days after tumor implantation. It is of importance to note that *in vivo* depletion with anti-NK1.1 antibody is complement-mediated, thus required prior to CVF treatment. We found that in the absence of NK cells, CVF treatment had no effect on tumor implantation and early development demonstrating that NK cells were necessary for the decreased tumor growth observed following de complementation (Fig. 4A).

Considering that T cell activation in the spleen is also increased in the absence of complement, we wanted to determine if de complementation also affected the induction of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. As assessed by intracellular cytokine staining of gp33 peptide-stimulated T cells from de complemented and control B16gp33-bearing mice, we found that complement inhibition led to higher levels of tumor-specific (gp33) T cells secreting mainly TNF α (Fig. 4B). Accordingly, the enhancement of gp33-specific CTL induction by CVF was also abolished in the absence NK cells indicating that the effect of de complementation on early tumor growth is largely mediated by CTLs (Fig. 4B). However, CVF-mediated de complementation did not lead to superior levels of gp33-specific cytotoxicity as assessed by CD107a expression, a marker of recent de granulation (Fig. 4C). Thus, in the B16 melanoma model, we demonstrate that CVF treatment limits early tumor growth and promotes a better availability of splenic and tumoral NK cells. This suggests that complement components and NK cells interact thus modulating tumor-specific CTL induction.

Therefore, our study has identified a previously unrecognized function for complement in tumor biology. We have shown that complement and NK cells interact and influence tumor growth by limiting tumor-specific CTL induction. Factors from the complement system may restrict NK cell availability in tumor tissue where NK cells would normally participate in the induction of a tumor-specific CTL response via, among other things, tumor cell lysis. Furthermore, complement proteins could also promote infiltration of the tumor by MDSCs that could then suppress lymphocyte function (Fig. 4D).

Many drugs targeting complement proteins are currently in clinical trials and few side effects have been reported (Kohl, 2006; Ricklin and Lambris, 2007). CVF has also been used

in laboratory animals for the treatment of various diseases. One of the limits of this treatment alternative in the clinic is the high immunogenicity of this compound (Gowda et al., 1994). However, a human C3 hybrid, containing crucial regions of the CVF β chain (so-called humanized CVF or HC3-1496), has been created for this purpose (Fritzinger et al., 2009). It will be of great interest to test other complement inhibitors currently in development in various solid tumor models to determine if sustained treatment will favour the induction of a better tumor-specific immune response and promote CD8⁺ T cell expansion. Thus, a better understanding of the link between complement proteins and NK cells in the development of tumors could lead to the design of new therapeutic strategies against cancer.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Simon Janelle for his help on the schematic illustration of the proposed model. This work was supported by the Jeanne and J.-Louis Lévesque Chair in Immunovirology to A.L. from the J.-Louis Lévesque Foundation. V.J. and M.-P.L. acknowledge studentship support from the Fondation Armand-Frappier. P.L. holds a Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQS) postdoctoral award and a Thomas F. Nealon, III Postdoctoral Research Fellowship from the American Liver foundation.

REFERENCES

- Arase, N., Arase, H., Park, S.Y., Ohno, H., Ra, C., and Saito, T. (1997). Association with Fc γ Is Essential for Activation Signal through NKR-P1 (CD161) in Natural Killer (NK) Cells and NK1.1+ T Cells. *The Journal of Experimental Medicine* 186, 1957-1963.
- Caron, E., and Hall, A. (1998). Identification of Two Distinct Mechanisms of Phagocytosis Controlled by Different Rho GTPases. *Science* 282, 1717-1721.
- Derynck, R., Akhurst, R.J., and Balmain, A. (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat. Genet.* 29, 117-129.
- Fernandez, N.C., Lozier, A., Flament, C., Ricciardi-Castagnoli, P., Bellet, D., Suter, M., Perricaudet, M., Tursz, T., Maraskovsky, E., and Zitvogel, L. (1999). Dendritic cells directly trigger NK cell functions: Cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat. Med.* 5, 405-411.
- Fritzing, D.C., Hew, B.E., Thorne, M., Pangburn, M.K., Janssen, B.J.C., Gros, P., and Vogel, C.-W. (2009). Functional characterization of human C3/cobra venom factor hybrid proteins for therapeutic complement depletion. *Developmental & Comparative Immunology* 33, 105-116.
- Gallina, G., Dolcetti, L., Serafini, P., Santo, C.D., Marigo, I., Colombo, M.P., Basso, G., Brombacher, F., Borrello, I., Zanovello, P., *et al.* (2006). Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *The Journal of Clinical Investigation* 116, 2777-2790.
- Gelderman, K.A., Tomlinson, S., Ross, G.D., and Gorter, A. (2004). Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. *Trends Immunol.* 25, 158-164.
- Gionanlis, L., Alexopoulos, E., Papagianni, A., Leontsini, M., and Memmos, D. (2008). Fibrotic Mechanisms in Idiopathic Rapidly Progressive Glomerulonephritis: The Role of TGF- β 1 and C5b-9. *Ren. Fail.* 30, 239-246.
- Gowda, D.C., Petrella, E.C., Raj, T.T., Bredehorst, R., and Vogel, C.W. (1994). Immunoreactivity and function of oligosaccharides in cobra venom factor. *The Journal of Immunology* 152, 2977-2986.

- Kohl, J. (2006). Drug evaluation: the C5a receptor antagonist PMX-53. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 8, 529-538.
- Macor, P., and Tedesco, F. (2007). Complement as effector system in cancer immunotherapy. *Immunol. Lett.* 111, 6-13.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436-444.
- Markiewski, M.M., DeAngelis, R.A., Benencia, F., Ricklin-Lichtsteiner, S.K., Koutoulaki, A., Gerard, C., Coukos, G., and Lambris, J.D. (2008). Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nat. Immunol.* 9, 1225-1235.
- Marsh, J.E., Farmer, C.K., Jurcevic, S., Wang, Y., Carroll, M.C., and Sacks, S. (2001). The allogeneic T and B cell response is strongly dependent on complement components C3 and C4. *Transplantation* 72, 1310-1318.
- Morelli, A.E., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Zahorchak, A.F., Logar, A.J., Papworth, G.D., Wang, Z., Watkins, S.C., Falo, L.D., and Thomson, A.W. (2003). Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood* 101, 611-620.
- Moretta, A., Bottino, C., Mingari, M.C., Biassoni, R., and Moretta, L. (2002). What is a natural killer cell? *Nat. Immunol.* 3, 6-8.
- Muto, S., Větvicka, V., and Ross, G. (1993). CR3 (CD11b/CD18) expressed by cytotoxic T cells and natural killer cells is upregulated in a manner similar to neutrophil CR3 following stimulation with various activating agents. *J. Clin. Immunol.* 13, 175-184.
- Ostrand-Rosenberg, S. (2008). Cancer and complement. *Nat. Biotechnol.* 26, 1348-1349.
- Penafuerte, C., and Galipeau, J. (2008). TGF β secreted by B16 melanoma antagonizes cancer gene immunotherapy bystander effect. *Cancer Immunol. Immunother.* 57, 1197-1206.
- Piccioli, D., Sbrana, S., Melandri, E., and Valiante, N.M. (2002). Contact-dependent Stimulation and Inhibition of Dendritic Cells by Natural Killer Cells. *The Journal of Experimental Medicine* 195, 335-341.
- Prevost-Blondel, A., Zimmermann, C., Stemmer, C., Kulmburg, P., Rosenthal, F.M., and Pircher, H. (1998). Tumor-infiltrating lymphocytes exhibiting high ex vivo cytolytic activity fail to prevent murine melanoma tumor growth in vivo. *J. Immunol.* 161, 2187-2194.

- Ricklin, D., and Lambris, J.D. (2007). Complement-targeted therapeutics. *Nat. Biotechnol.* *25*, 1265-1275.
- Roda, J.M., Parihar, R., Lehman, A., Mani, A., Tridandapani, S., and Carson, W.E. (2006). Interleukin-21 Enhances NK Cell Activation in Response to Antibody-Coated Targets. *The Journal of Immunology* *177*, 120-129.
- Rutkowski, M.J., Sughrue, M.E., Kane, A.J., Mills, S.A., and Parsa, A.T. (2010). Cancer and the Complement Cascade. *Mol. Cancer Res.* *8*, 1453-1465.
- Venkatesha, R.T., Thangam, E.B., Zaidi, A.K., and Ali, H. (2005). Distinct regulation of C3a-induced MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5 production in human mast cells by extracellular signal regulated kinase and PI3 kinase. *Mol. Immunol.* *42*, 581-587.
- Vitale, M., Chiesa, M.D., Carlomagno, S., Pende, D., Aricò, M., Moretta, L., and Moretta, A. (2005). NK-dependent DC maturation is mediated by TNF α and IFN γ released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood* *106*, 566-571.
- Vogel, C.W., Smith, C.A., and Müller-Eberhard, H.J. (1984). Cobra venom factor: structural homology with the third component of human complement. *The Journal of Immunology* *133*, 3235-3241.
- Wang, S.-Y., Racila, E., Taylor, R.P., and Weiner, G.J. (2008). NK-cell activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity induced by rituximab-coated target cells is inhibited by the C3b component of complement. *Blood* *111*, 1456-1463.
- Wang, S.-Y., Veeramani, S., Racila, E., Cagley, J., Fritzinger, D.C., Vogel, C.-W., St John, W., and Weiner, G.J. (2009). Depletion of the C3 component of complement enhances the ability of rituximab-coated target cells to activate human NK cells and improves the efficacy of monoclonal antibody therapy in an in vivo model. *Blood* *114*, 5322-5330.

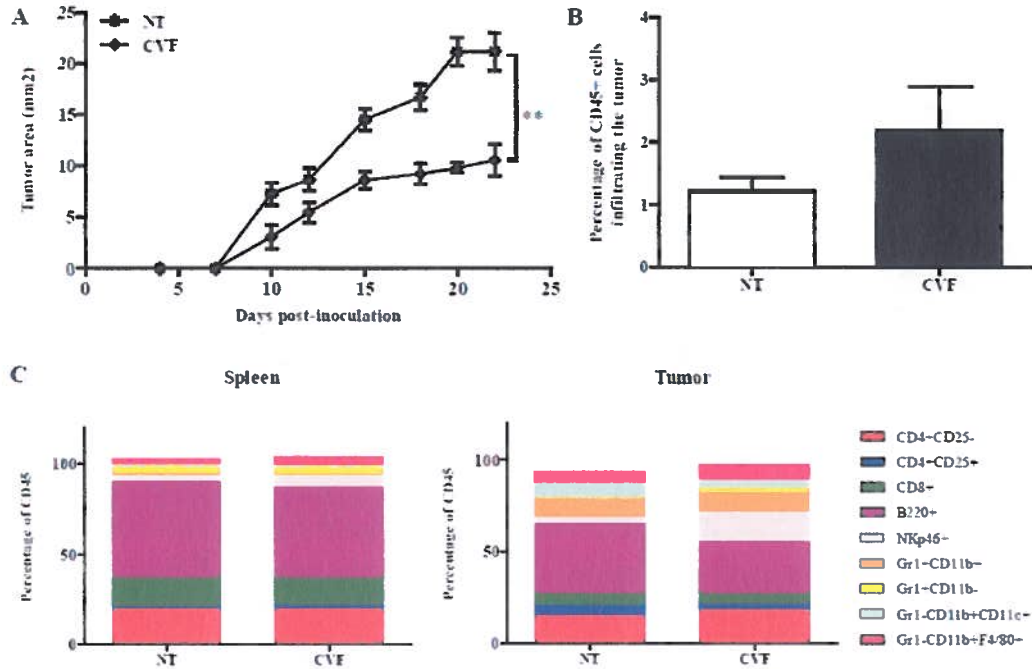


Figure 1. Effect of CVF treatment on B16 tumor growth and immune cell infiltration. C57Bl/6 mice were injected subcutaneously with B16 (day 0) and CVF was administered by intra-peritoneal injection on day 6. **A**, Tumor growth was measured at indicated time points. Data show the mean \pm SEM and are representative of two independent experiments. ****** $P < 0.01$. **B**, Nine days following CVF treatment, tumor and spleen were harvested and total tumor CD45⁺ cells and **C**, immune cell subpopulation proportions of CD4⁺ T cells (CD4⁺CD25⁻), regulatory T cells (CD4⁺CD25⁺), CD8⁺ T cells, B cells (B220⁺), NK (NKp46⁺), MDSC (Gr1⁺CD11b⁺), neutrophils (Gr1⁺CD11b⁻), dendritic cells (Gr1⁻CD11b⁺CD11c⁺) and macrophages (Gr1⁻CD11b⁺F4/80⁺) were determined.

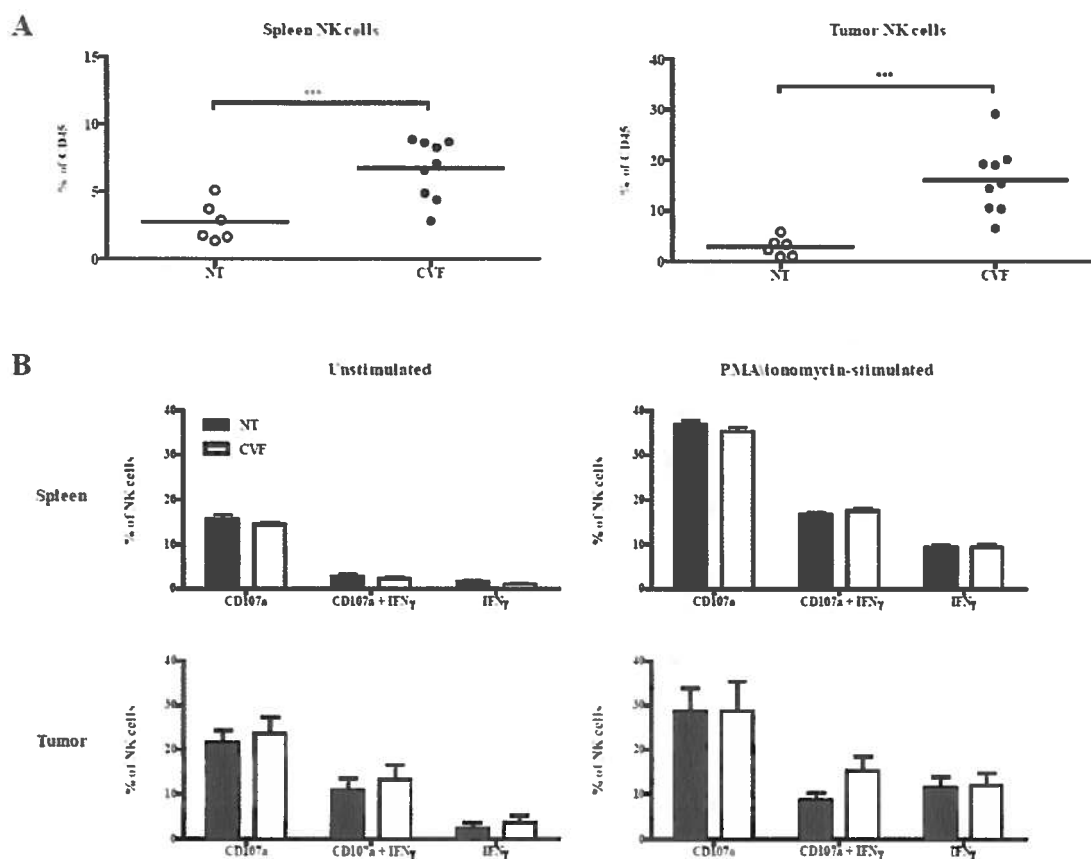


Figure 2. Decomplementation increases NK cell availability without affecting their effector function. B16gp33-bearing mice were treated or not with CVF. On day 9 following treatment, spleen and tumor were harvested. **A**, Percentage of NK cells among CD45⁺ cells. Mean \pm SEM are shown (n=9). *** $P < 0.001$. **B**, NK degranulation assay in YAC-1 co-cultures (10:1 Effector-target ratio) with or without PMA-ionomycin. Data are the mean \pm SEM of three independent experiments (n=9).

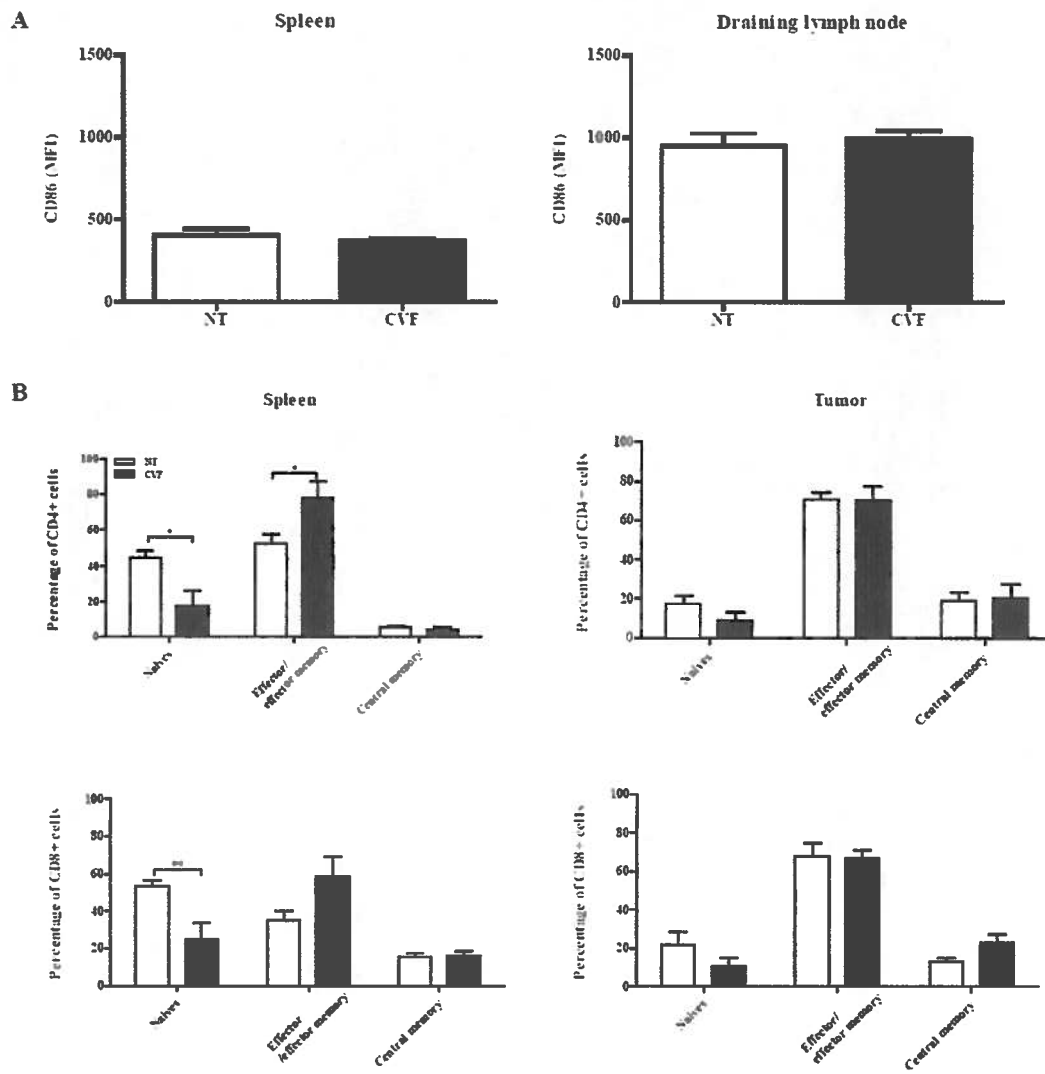


Figure 3. Increased systemic T cell activation following CVF treatment. **A**, Spleen and draining lymph nodes were harvested 9 days following CVF treatment and DC activation was assessed by CD11c and CD86 staining. Data are the mean \pm SEM of two independent experiments (n=6). **B**, T cell activation was assessed by CD62L and CD44 staining on spleen and tumor. Naïve (CD62L⁺CD44⁻), effector/effector memory (CD62L⁻) and central memory T cells (CD62L⁺CD44⁺) are shown. Data are the mean \pm SEM of three independent experiments (n=9). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

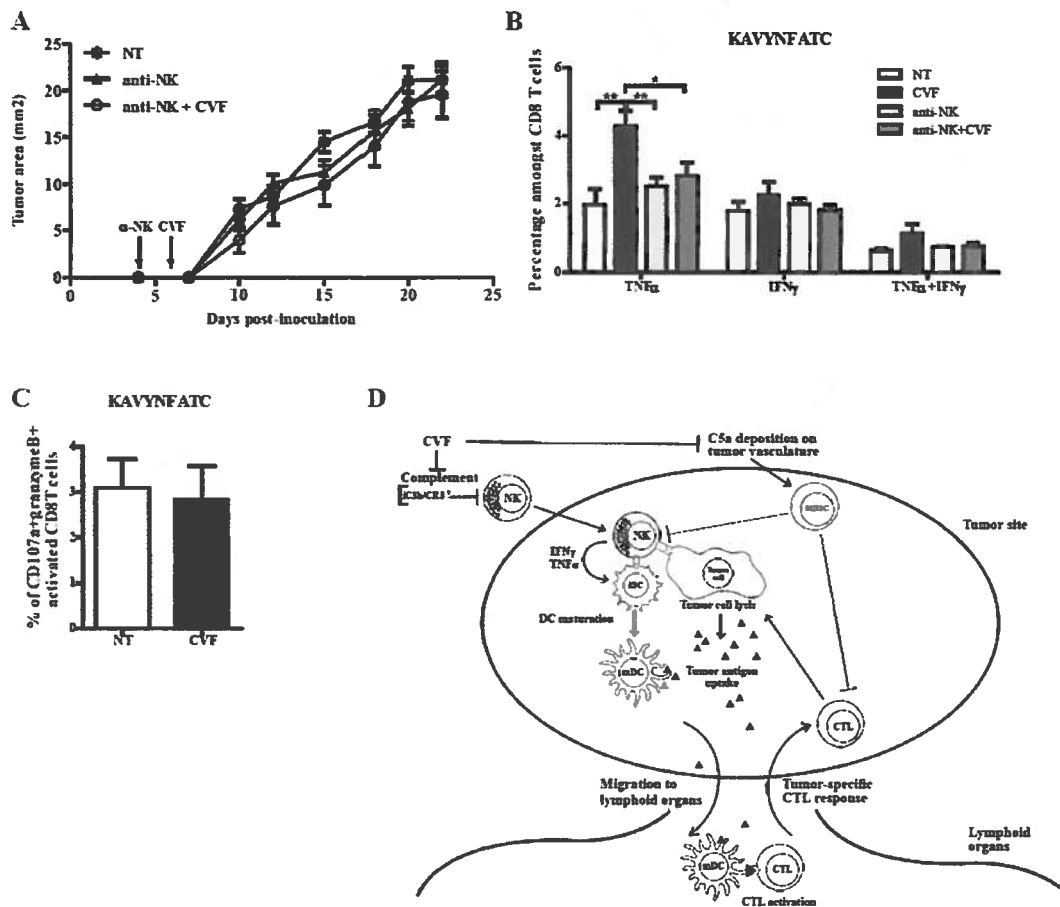
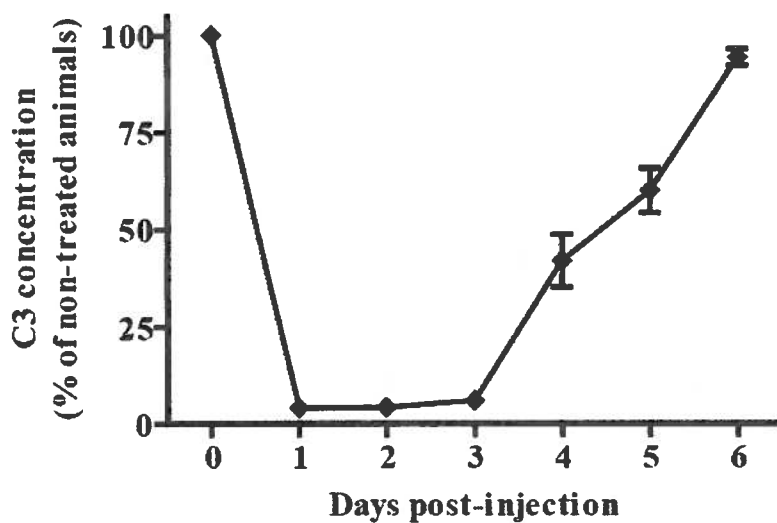
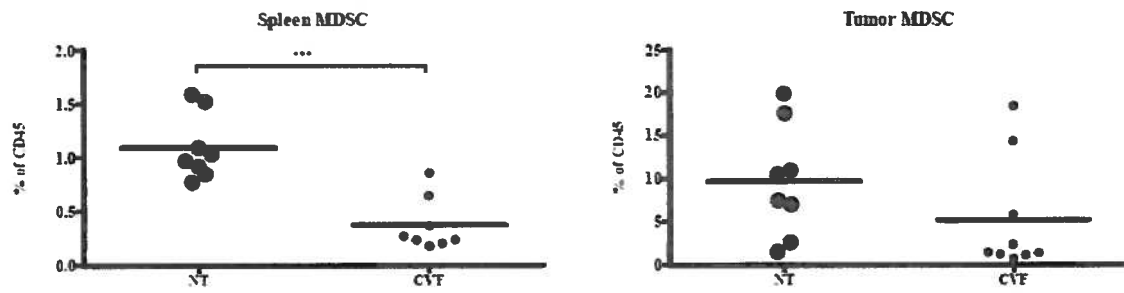


Figure 4. Influence of NK cells on CVF therapy. **A**, C57Bl/6 mice were injected subcutaneously with B16 cells (n=6-8), NK-depleted or not at day 4 and treated or not with CVF at day 6. Tumor growth was measured at indicated time points. Data show the mean \pm SEM and are representative of two independent experiments. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$. **B**, C57Bl/6 mice were injected subcutaneously with B16gp33 cells, NK-depleted or not at day 4 and treated or not with CVF at day 6. Nine days following CVF treatment, spleen was harvested and an *ex vivo* stimulation with the gp33 (KAVYNFATC) peptide was performed to analyze cytokine secretion and **C**, degranulation. Data are the mean \pm SEM of two independent experiments (n=6). **D**, Proposed model for the influence of complement proteins and NK cells in the B16 melanoma model. Inhibition of the complement system by CVF allows for increased NK cell availability in tumor tissue. This expanded proportion of NK cells leads to increased tumor cell lysis and antigen release thus facilitating activation of

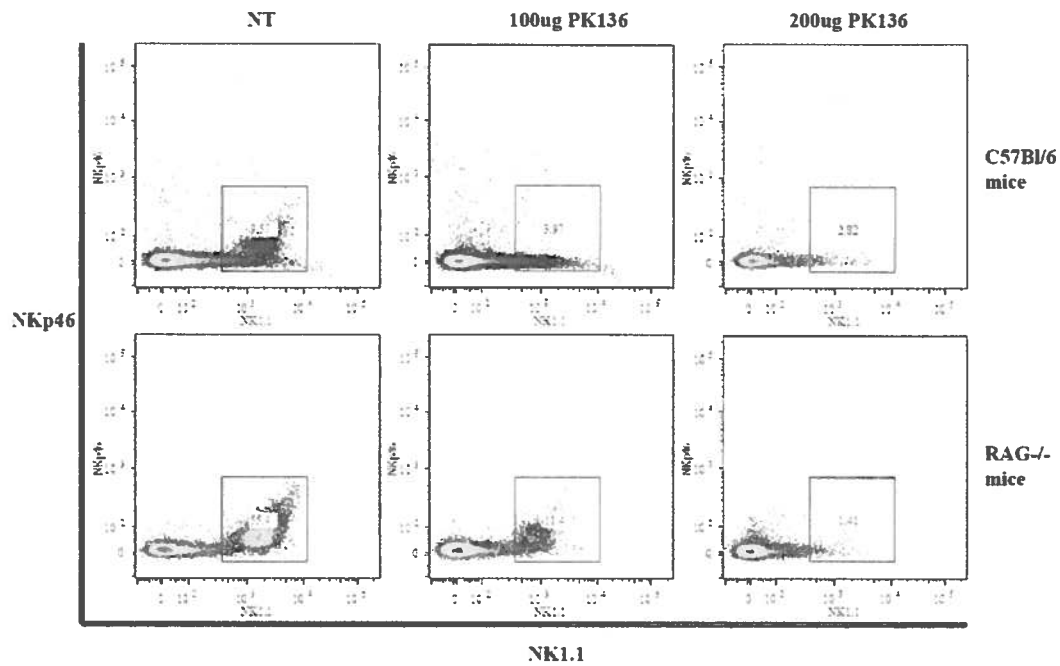
tumor-specific CD8⁺ T lymphocytes. Inhibition of complement proteins also acts on MDSC and limits the immunosuppressive tumor microenvironment leading to increased CTL activation. Abbreviations: CTL, cytotoxic T lymphocyte; CVF, cobra venom factor; IFN γ , interferon gamma; iDC, immature dendritic cell; mDC, mature dendritic cell; MDSC, myeloid-derived suppressor cell; NK, natural killer cell; TNF α , tumor-necrosis factor alpha.



Supplemental Figure 1. Complement system inhibition by CVF. C57Bl/6 mice (n=3) were injected intraperitoneally with CVF (20 μ g) at day 0. C3 molecule concentration in sera was measured every following day and ratios over non-treated animals are shown. Data show the mean \pm SEM and are representative of three independent experiments.



Supplemental Figure 2. MDSC proportions following CVF treatment. B16-bearing mice were treated or not with CVF. On day 9 following treatment, spleen and tumor were harvested. Percentage of MDSC among CD45⁺ cells is shown. Mean ± SEM (n=9). ****P* < 0.001.



Supplemental Figure 3. Effectiveness of NK cell depletion. C57Bl/6 and RAG^{-/-} mice (which are known to possess high numbers of NK and NKT cells) were injected intraperitoneally with either 100 or 200 μ g of anti-NK1.1 antibody (clone PK136). Spleen was harvested two days later and analyzed. NKp46 and NK1.1 staining of CD3⁺ cells are shown. Complete depletion was achieved with 200 μ g in both mouse strains.

DISCUSSION

Le cancer est une maladie aussi diversifiée qu'il y a de cas répertoriés. Étant donné la grande variabilité des cellules transformées de même que les différents organes pouvant être affectés, il devient très difficile de trouver un traitement pouvant convenir à toutes les situations. De plus, les traitements conventionnels actuels ne sont pas toujours bien tolérés ou ne sont que partiellement efficaces. Heureusement, de plus en plus de recherche se fait pour trouver des traitements alternatifs plus ciblés et générant moins d'effets secondaires.

Les approches expérimentales utilisant des virus pour le traitement de divers cancers se sont développées exponentiellement dans la dernière décennie. Depuis quelques années, de nombreuses études cliniques analysant l'efficacité et la sécurité d'une variété de virus oncolytiques contre plusieurs types de cancers ont été réalisées. Ces études ont toutefois révélé des résultats mixtes mettant l'accent sur le besoin urgent de poursuivre la recherche sur cette approche prometteuse (Liu et al., 2007; Sinkovics and Horvath, 2008).

Comme décrit précédemment, le principe de la virothérapie oncolytique réside dans la réplication préférentielle de certains virus dans les cellules cancéreuses, ayant souvent perdu divers effecteurs impliqués dans la réponse antivirale, tout en épargnant les cellules saines. Le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), un des virus oncolytiques les mieux caractérisés, a démontré un grand potentiel en études pré-cliniques (Bridle et al., 2010; Hadaschik et al., 2008; Power et al., 2007; Qiao et al., 2008b; Wu et al., 2008). Malgré la disponibilité de bons mutants oncolytiques de VSV, la large variabilité des types tumoraux et les multiples façons par lesquelles les tumeurs peuvent échapper à l'infection virale suggèrent qu'une combinaison thérapeutique sera nécessaire afin de traiter efficacement la majorité des cancers.

Des nouveaux mutants de la glycoprotéine d'enveloppe du VSV.

À la lumière de ces connaissances, nous avons tout d'abord voulu déterminer si certaines mutations dans le génome du VSV pouvaient contribuer à l'augmentation de son potentiel oncolytique. Pour ce faire, la souche parentale a été comparée au mutant de la matrice souvent utilisé dans les études d'oncolyse virale, puis à quatre autres mutants non

caractérisés. Ces derniers ont été isolés sans mutagenèse par l'équipe de Stanners selon un test de plages de lyse modulées par l'interféron de type I (Francoeur et al., 1980; Francoeur et al., 1987). Deux de ces mutants, alors appelés TP5 et TP6, ont été caractérisés comme inducteurs d'interféron avec un phénotype thermosensible. Leur révertant, résistant à des températures plus élevées, appelés TP5R1 et TP6R1, ont également la capacité de faire chuter drastiquement la synthèse protéique totale des cellules infectées.

Nous avons donc dressé un portrait global de la relation hôte-pathogène lors de l'utilisation de ces variants du VSV. Tout d'abord, le séquençage des mutants inducteurs d'interféron a démontré que seule la glycoprotéine d'enveloppe des virus était touchée et les mutants ont donc été renommés G₅, G_{5R}, G₆ et G_{6R}. De plus, la thermosensibilité des mutants G₅ et G₆ a pu être vraisemblablement attribuée à la mutation en position 216; l'acide aspartique original pourrait effectivement former un lien ionique stabilisant la protéine, effet perdu avec l'apparition d'une glycine en cette position.

La grande particularité des nouveaux mutants de G provient de leur protéine de la matrice intacte. Plusieurs études avaient auparavant déterminé que la protéine M seule, en plus de bloquer les pores nucléocytoplasmiques, a la capacité d'inhiber la transcription et traduction cellulaire, contribuant ainsi à l'induction de l'apoptose et à la suppression de la synthèse d'interféron de type I par les cellules infectées (Ahmed et al., 2003; Kopecky and Lyles, 2003a; Kopecky et al., 2001). Nous avons également déterminé que les mutants de G ont une répllication similaire à celle de la souche sauvage et ne sont donc pas atténués comme le mutant de M; ceci principalement dû à leur effet d'inhibition drastique de la transcription d'ARN et de la synthèse protéique cellulaire.

Induction d'interféron malgré la présence d'une protéine de la matrice sauvage.

Il était toutefois contre-intuitif de penser que les mutants de G pourraient induire une sécrétion d'interféron, tout comme c'est le cas avec la souche mutante dans la protéine de la matrice, malgré leur isolement originel à partir d'un essai de plages modulées par cette cytokine. Nous avons donc quantifié la sécrétion d'interféron- β dans le milieu extracellulaire.

C'est ainsi que nous avons démontré qu'à faible multiplicité d'infection (MOI), les cellules infectées, du moins avec le mutant G_{6R}, ont la possibilité d'induire la cascade signalétique de l'interféron, ce qui est perdu à forte MOI dû aux effets cytopathiques très rapides. Trois hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène (Figure 6).

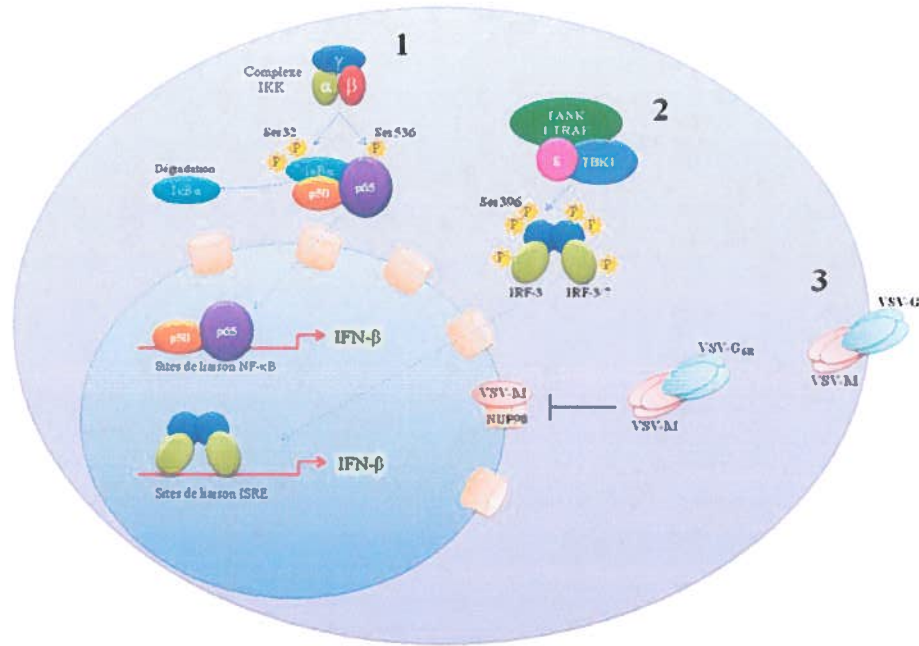


Figure 6. Hypothèses pouvant expliquer la sécrétion d'interféron de type I par les mutants de G. 1) Implication possible des mutants de G du VSV dans la phosphorylation de IκBα pour induire sa dégradation ou de la sous-unité p65 de NF-κB pour sa translocation au noyau. 2) Implication possible de G_{6R} dans la phosphorylation de IRF-3 pour son homodimérisation ou l'hétérodimérisation avec IRF-7 permettant alors la transcription de gènes tels que l'interféron-β. 3) Interaction possible de G_{6R} avec la protéine de la matrice, séquestrant cette dernière et limitant sa liaison avec NUP98.

Premièrement, certains virus, comme le virus respiratoire syncytial (RSV), peuvent permettre la phosphorylation de la sérine en position 536 de la sous-unité p65 de NF-κB et ainsi contribuer à sa translocation nucléaire (Yoboua et al., 2010). Dans un même ordre d'idée, la phosphorylation de la sérine 32 de l'inhibiteur de NF-κB, IκBα, médie sa dislocation du complexe et sa dégradation laissant les sous-unités p50 et p65 libres de se lier et d'initier, entre autres, la transcription de l'interféron-β. Des résultats préliminaires (non publiés) nous ont démontré que la souche sauvage, de même que certains mutants de G (principalement G₅ et G_{5R}) peuvent induire la phosphorylation de p65 à 24 heures post-

infection. De plus, tous les mutants, à l'exception de M_{M51R} , permettraient la dégradation totale de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$. Cependant, étant donné la différence de cinétique de répllication des virus, il se peut que ceci influe également sur la cinétique d'activation de la cascade $\text{NF-}\kappa\text{B}$.

Deuxièmement, certaines études ont démontré que le facteur régulateur de l'interféron 3 (IRF-3) est directement activé lors d'une infection virale et sert aussi d'activateur des gènes d'interféron de type I (Au et al., 1995). La sérine en position 396 a d'ailleurs été caractérisée comme le site minimal requis pour l'activation *in vivo* d'IRF-3 par le virus Sendai. Les kinases $\text{IKK}\epsilon/\text{TBK-1}$ seraient des composantes médiant la phosphorylation d'IRF-3 et IRF-7 liant alors les fonctionnalités des cascades $\text{NF-}\kappa\text{B}$ et IRF dans le développement de réponses antivirales (Hiscott et al., 2003). La dimérisation d'IRF-3 par les différents mutants de VSV est visible entre 6 et 12 heures post-infection. Cependant, la phosphorylation spécifique de la sérine 396 de même que l'hétérodimérisation IRF-3/IRF-7 n'ont jamais été analysées et pourraient alors faire la lumière sur les mécanismes menant le mutant G_{6R} à induire des taux significatifs d'interféron.

Troisièmement, il a déjà été établi que la protéine de la matrice peut se lier à la nucléopore NUP98 et ainsi bloquer le transport nucléocytoplasmique d'ARNm (Petersen et al., 2000). Sa version mutée au niveau de la méthionine 51 empêche cette association. Cependant, l'équipe du Dr Zhou de l'Université de Californie à Los Angeles a permis de déterminer par cryo-microscopie électronique que la protéine de la matrice pouvait également interagir directement avec la glycoprotéine d'enveloppe au niveau de la membrane plasmique lors de l'assemblage du virion (Ge et al., 2010). Il serait alors possible qu'une mutation sur la protéine G puisse favoriser une interaction plus précoce et ainsi séquestrer la protéine M dans des complexes M-G limitant donc la liaison de cette dernière aux complexes de pore nucléaires.

Différents mutants du VSV ayant des propriétés intrinsèques d'oncolyse variables.

Afin de déterminer s'il existe un avantage à utiliser ces nouveaux outils viraux dans une optique de traitement oncolytique, nous avons testé ces mutants sur un panel de cellules

tumorales humaines et murines. Étant donné le large tropisme du VSV tant sur des cellules animales que végétales, ceci le rend très intéressant pour la virothérapie oncolytique pour deux grandes raisons. D'une part, il peut infecter tout type de cellules tumorales peu importe l'origine, et d'autre part, il peut facilement par la suite être étudié en modèle murin en conservant une pertinence biologique chez l'humain. C'est donc dans cette idée que nous avons évalué la capacité et la rapidité d'élimination par les divers mutants du VSV de cellules humaines de carcinome de poumon de Lewis (3LL), de carcinome hépatocellulaire (HepG2), de lymphocytes T immortalisés (Jurkat), de même que de cellules murines de mélanome (B16), de fibrosarcome (MC57) et de lymphome (EL4). Il est alors devenu évident que certaines associations virus-cellules sont plus avantageuses que d'autres. En effet, toutes les cellules testées sont susceptibles au VSV sans considération de l'espèce. Cependant, malgré que la plupart des cellules soient éliminées selon une même cinétique peu importe le mutant viral utilisé, certains types cellulaires présentent une susceptibilité variable. C'est entre autres le cas du fibrosarcome MC57 et du mélanome B16. Le premier type cellulaire a été plus ou moins résistant à la souche sauvage et aux mutants G₅ et M_{M51R}. Les mutants G_{5R}, G₆ et G_{6R} ont quant à eux permis l'élimination de seulement 50% des cellules après 60 heures d'infection. C'est toutefois au niveau du mélanome B16 que les données se sont révélées très intéressantes. En effet, on peut faire la ségrégation de trois groupes selon leur habileté d'élimination de ces cellules. Tout d'abord, le mutant de M a une cinétique lente avec moins de 50% des cellules détruites à 60 heures post-infection, ce qui corrèle avec son potentiel cytopathique faible. Ensuite viennent les virus WT et G₅ avec une cinétique intermédiaire, mais une élimination cellulaire de plus de 75%. Finalement, on retrouve les mutants G_{5R}, G₆ et G_{6R} possédant des effets cytopathiques rapides pour les cellules B16. Ce qui est d'autant plus intéressant est l'effet observé avec les fibroblastes murins non transformés (L929). On y voit alors une cinétique particulièrement rapide du mutant M_{M51R} et une vitesse de destruction cellulaire plus intermédiaire pour les autres souches. Ceci nous démontre bien que certains mécanismes, dérégulés lors de la transformation des cellules tumorales, confèrent des avantages de réplication virale.

Afin de vérifier si ces avantages ont un lien avec l'induction de l'apoptose, nous avons regardé globalement les niveaux d'activation des caspases dans ces deux mêmes types

cellulaires (L929 et B16). Des études précédentes ont impliqué la protéine de la matrice dans l'induction de l'apoptose par le VSV et ce, principalement dû son action inhibitrice de l'expression des gènes cellulaires (Kopecky and Lyles, 2003b; Kopecky et al., 2001). Cependant, une différence notable était observée en fonction du type cellulaire choisi et du virus utilisé (Kopecky and Lyles, 2003b). De plus, l'importance de l'induction de l'apoptose lors d'une infection par VSV a été démontrée puisqu'une activation restreinte de cette voie de signalisation par des variants moins cytopathiques peut mener, dans certaines circonstances, à la persistance du virus comme c'est le cas avec le mutant M_{M51R} (aussi appelé T1026) (Desforges et al., 2002). Il est apparu qu'outre la voie mitochondriale régulée par des protéines de la famille Bcl-2, autant la souche sauvage que le mutant G₆ du VSV peuvent induire l'apoptose par la voie intrinsèque (impliquant la caspase-9) et/ou extrinsèque (associée à la caspase-8) (Desforges et al., 2002). Finalement, les mutants G₅ et G₆ ont également été caractérisés comme incapables d'établir de persistance cellulaire (Desforges et al., 2001). En concordance avec ces données, nous avons aussi observé une grande variabilité dans l'activation des caspases selon le variant utilisé et ces cinétiques corrélaient avec la baisse d'activité mitochondriale que nous observons. Ainsi, le mutant de M permet une activation des caspases très rapide et soutenue sur les fibroblastes non transformés, mais une activation beaucoup plus faible dans les cellules de mélanome alors que l'inverse est vrai avec les souches ayant une protéine de la matrice sauvage. De plus, la même ségrégation en trois groupes est observable dans les cellules de mélanome.

Ces résultats démontrent bien que diverses modifications d'un virus peuvent faire varier son potentiel intrinsèque d'oncolyse. Cependant, le cancer étant une maladie multifactorielle de beaucoup influencée par le microenvironnement tumoral, ce n'est pas un gage de succès préclinique. C'est pourquoi cette caractérisation virale a servi de prémice à une étude approfondie des mécanismes immunitaires induits par la virothérapie oncolytique encore jusqu'ici mal compris.

Choisir des outils diversifiés pour l'étude de mécanismes immunitaires.

De nombreuses évidences démontrent qu'en plus d'une lyse directe des cellules tumorales par le virus, l'induction d'une immunité antitumorale est la clé de la régression tumorale par virothérapie oncolytique (Bridle et al., 2010; Chiocca, 2008; Diaz et al., 2007; Gao et al., 2009; Prestwich et al., 2009). Toutefois, bien comprendre les mécanismes menant à la génération d'une réponse immunitaire dirigée contre la tumeur nous permettra de choisir des outils viraux réellement efficaces et adaptés aux diverses situations.

Afin de nous pencher sur la question de l'immunité antitumorale induite par la virothérapie oncolytique, nous avons choisi comme candidats le virus sauvage et les mutants G₆, G_{6R} et M_{M51R}; ces derniers ayant démontré les caractéristiques les plus diversifiées *in vitro* (Tableau 4).

Tableau 4. Récapitulation des caractéristiques principales des mutants de VSV utilisés en vue d'étude de virothérapie oncolytique.

VSV	Particularité	Thermosensible	Inducteur d'IFN- β	Cytopathique sur B16
WT	-	Non	+/-	+
G ₆	Muté dans G	Oui	+/-	++
G _{6R}	Muté dans G	Non	++	++
M _{M51R}	Muté dans M	Oui	++	-

Le VSV a tout d'abord été considéré en vue de thérapie oncolytique étant donné sa grande sensibilité à l'IFN puisqu'il se réplique préférentiellement dans les cellules tumorales déficientes dans la cascade de sécrétion de cette cytokine. Puis, de plus en plus d'études se sont penchées sur le mutant M_{M51R} compte tenu de sa possibilité à induire l'interféron dans les cellules saines puisque sa protéine de la matrice ne bloque plus l'export nucléaire de l'ARNm de l'IFN. Nous avons par la suite démontré que le mutant de la glycoprotéine d'enveloppe G_{6R} peut induire des taux d'IFN- β similaires au mutant M_{M51R}, ce qui en fait un

outil intéressant considérant son effet cytopathique plus intense sur le mélanome B16. Finalement, le mutant G₆, ayant un phénotype thermosensible dû à une seule mutation différente de G_{6R}, garde son effet cytopathique rapide, mais sans toutefois induire une quantité d'interféron- β significative (bien qu'il soit tout de même isolé selon un test d'induction de l'interféron). C'est en comparant l'action de ces divers mutants avec la souche sauvage sur la génération d'une réponse immunitaire antitumorale que nous avons voulu déterminer s'il y avait une corrélation entre le potentiel oncolytique *in vitro* des virus et leur action immunomodulatrice.

La virothérapie par VSV agit sur plusieurs types de cellules immunitaires.

La découverte des mutations dans la glycoprotéine d'enveloppe des virus G₆ et G_{6R} près de l'épitope neutralisant dominant du VSV en position 238 (Vandepol et al., 1986b) de même que le potentiel des mutants à induire l'expression de calréticuline à la surface des cellules infectées (Janelle et al., 2013) nous a mené à l'hypothèse que ces derniers pourraient induire une immunomodulation *in vivo* diversifiée en comparaison avec la souche parentale et le mutant de M. Nous avons opté pour le modèle de mélanome B16 transfecté avec un minigène codant pour l'épitope immunodominant gp33 de la glycoprotéine d'enveloppe du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) afin de pouvoir suivre une réponse immunitaire spécifique de cet antigène. Nous avons en effet pu déterminer que les différents traitements oncolytiques, lorsqu'administrés directement au site tumoral à raison de trois doses dans des souris portant le mélanome B16gp33, permettent bien le recrutement de lymphocytes T CD8⁺ illustré par sa plus grande proportion parmi les cellules CD45⁺ infiltrantes. Étant donné la grande variabilité dans les tailles des tumeurs à ce temps précis, cette méthode a été privilégiée par rapport au compte total de cellules. Une augmentation de la proportion de cellules myéloïdes suppressives a aussi été observée. Comme tout est dynamique, cela nous démontre bien que la balance entre une réponse pro-inflammatoire et une suppression de l'immunité est très précaire. En effet, le nombre de cellules effectrices versus la proportion de cellules inhibitrices, ou encore le degré d'activation ou la fonctionnalité de chacun des types cellulaires, déterminera l'efficacité de la réponse antitumorale générée. Dans le même ordre d'idée, les traitements par VSV semblent diminuer

les lymphocytes T régulateurs (Treg), généralement suppresseurs de la réponse T, mais également les cellules dendritiques (DCs) limitant ainsi la présentation d'antigènes tumoraux. Ceci indique bien que l'arrivée du virus dans la tumeur modifie le microenvironnement, mais il est aussi possible que le virus infecte directement les cellules immunitaires recrutées comme les DCs, rendant alors difficile d'attester si la présence du virus est majoritairement bénéfique ou non.

Nous avons tout de même démontré que malgré cette diminution de cellules présentatrices d'antigènes, une réponse immunitaire locale (lymphocytes T intratumoraux) et systémique (lymphocytes T spléniques) a lieu suite au traitement. En effet, une augmentation significative de la proportion de lymphocytes T CD8⁺ fonctionnels et cytotoxiques reconnaissant l'épitope gp33 a été observée. Cependant, seuls les virus ayant une protéine de la matrice non mutée ont permis cette induction, sans toutefois qu'il y ait de différence entre la souche sauvage et les mutants de G. On remarque également que la thermosensibilité des variants du VSV ne semble pas corrélée avec l'induction d'une réponse immunitaire antitumorale.

Ceci mène donc à considérer le fait qu'il doit y avoir présentation de l'antigène gp33 malgré la chute drastique de DCs intratumoraux observée. Une étude récente a également démontré que les traitements par VSV abolissent la présentation antigénique en interférant avec les fonctions des cellules dendritiques dans les ganglions lymphatiques drainants la tumeur (Leveille et al., 2011). Puisque l'équipe du Dr. Hiscott a utilisé le mutant de M induisant une faible réponse antitumorale, nous avons émis l'hypothèse que la souche parentale ou les mutants de G interféreraient moins avec la présentation antigénique. Afin de quantifier ce phénomène, nous avons transféré adoptivement des lymphocytes T CD8⁺ transgéniques purifiés (reconnaissant spécifiquement l'épitope gp33; provenant de souris P14) et marqués afin de suivre leur prolifération *in vivo* suite à une présentation antigénique gp33-spécifique. Cependant, l'affinité du TCR P14 pour son ligand est bien plus faible que celui du modèle OT-1 utilisé dans l'étude de Leveille *et al.* (Jones et al., 2008). Due à la faible quantité d'antigènes tumoraux migrant aux ganglions lymphatiques drainants, nous avons donc été dans l'incapacité d'atteindre un seuil de détection mesurable quant à la

prolifération de cellules T CD8⁺ gp33-spécifiques. Néanmoins, nous avons pu observer une activation globale des DCs spléniques, représentée par une augmentation significative de leurs molécules de co-stimulation CD86, suite au traitement par l'un ou l'autre des variants du VSV (résultat non publié). Ceci suggère alors que la présentation antigénique dans ce modèle est faible et difficile à détecter, mais que cela conduit tout de même à une réponse lymphocytaire spécifique. Il est aussi à noter que nous retrouvons une grande proportion de lymphocytes B intratumoraux qui pourraient, en contrepartie, contribuer à la présentation antigénique.

Les différents traitements mènent à la prolongation de la survie des souris.

Les résultats obtenus au niveau de la génération d'une réponse immunitaire antitumorale semblent pointer vers l'implication de la protéine de la matrice comme composante importante du traitement par VSV. En effet, les mutants de G ont, de façon générale, permis l'établissement d'une réponse contre l'épitope gp33 selon une amplitude semblable à la souche sauvage. Cependant, le mutant de M ne parvient pas à induire significativement de réponse immunitaire contre cet antigène. Toutefois, lorsqu'on s'attarde à la survie globale des souris traitées, tous les virus permettent de limiter la croissance tumorale et prolongent leur survie. Cela indique donc que les mutations sur la protéine de la matrice restreignent l'induction d'une réponse gp33-spécifique, mais peuvent tout de même induire une réponse antitumorale conduisant à la survie des animaux.

Ceci mène alors à considérer qu'un autre mécanisme influe sur le mode d'action du virus M_{M51R}. Puisque ce dernier est moins cytopathique que la souche parentale, il semble peu probable qu'une lyse plus importante des cellules tumorales soit impliquée. Nous nous sommes donc penchés sur la réponse en anticorps neutralisants contre le virus suite au traitement. Dans un premier temps, nous avons déterminé que le mutant de M génère effectivement moins d'anticorps neutralisants que la souche parentale ou les mutants de G. Cependant, cela ne permet pas de prolonger la présence du virus dans la tumeur puisque pour tous les traitements, nous ne retrouvons aucun virion infectieux quatre jours après la dernière

infection démontrant que la quantité d'anticorps est suffisante pour une élimination efficace du virus. Dans un second temps, puisque les mutations de G sont à proximité de l'épitope neutralisant dominant du VSV, nous avons cherché à déterminer si la génération des anticorps contre G₆ et G_{6R} pouvait interagir de façon croisée avec la glycoprotéine sauvage de la souche parentale. Il a été démontré que c'était effectivement le cas, limitant alors la possibilité de faire plusieurs cycles d'infection avec des mutants différents qui ne seraient pas encore neutralisés.

Considérant que l'efficacité du virus M_{M51R} n'est pas directement liée à la cinétique de réplication du virus dans l'organisme, nous nous sommes penchés de nouveau sur la réaction du système immunitaire lors des traitements. Afin de déterminer si une réponse en CTL est essentiellement et suffisante à l'efficacité du traitement, nous avons transféré des lymphocytes T CD8⁺ purifiés générés lors des traitements du mélanome B16gp33 par les différentes souches de VSV à des souris naïves que nous avons inoculé avec la tumeur mère B16. De cette façon, il a été démontré hors de tout doute qu'une réponse immunitaire efficace est montée contre la tumeur lors du traitement avec M_{M51R} et que l'immunothérapie seule parvient à prolonger significativement la survie des souris, tout comme c'est le cas avec les souches sauvage, G₆ et G_{6R}. Cela indique donc que les virus cytopathiques ayant une protéine de la matrice non mutée peuvent induire une réponse immunitaire spécifique à l'épitope gp33 et que ceci corrèle avec un certain contrôle tumoral et une prolongation de la survie des animaux. Cependant, nous démontrons ici que le contraire n'est pas une indication de l'inefficacité du traitement. Dans le cas du mutant M_{M51R}, il semble y avoir un bris de tolérance plus large à des antigènes tumoraux plus variés rendant ce traitement tout aussi efficace que les autres. Ceci pourrait vraisemblablement être dû au fait que l'infection par le mutant de M induit une régulation à la hausse des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) à la surface des cellules B16. Ceci contribue à une meilleure reconnaissance des cellules tumorales infectées par le système immunitaire pour la génération d'une réponse plus diversifiée. Il est toutefois important de mentionner que ce phénomène peut en contrepartie inhiber la reconnaissance par les cellules NK des cellules tumorales présentant peu ou pas de CMH à leur surface, limitant ainsi l'efficacité du traitement.

La voie PD-1/PD-L1 dans la réponse immunitaire n'influence pas directement les traitements.

Bien que le mutant G_{6R} induise une réponse anti-gp33 plus polyfonctionnelle (sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α), il n'y a pas de réelle différence entre les mutants de G et la souche parentale dans l'établissement d'une réponse antitumorale. De plus, le bris de tolérance induit par tous les traitements est faible et ne parvient pas à éliminer le mélanome qui est très agressif. C'est pourquoi il devient intéressant d'explorer d'autres voies potentielles pouvant agir sur cette immunomodulation induite par la virothérapie.

De nombreuses études ont démontré que le système immunitaire devient souvent épuisé dans les cas de stimulation persistante induite par des infections chroniques ou des cancers. Une molécule intimement liée à cet épuisement est la protéine PD-1. Lorsque cette dernière reconnaît son ligand PD-L1 ou PD-L2, un signal de régulation négatif inhibe la fonction des lymphocytes T. L'immunothérapie par blocage de PD-1 est donc de plus en plus d'actualité, démontrant des signes prometteurs autant dans le contrôle de la virémie chez des patients atteints d'hépatite C chronique (Gardiner et al., 2013), du virus de l'immunodéficience humaine (Porichis and Kaufmann, 2012) ou même de régression de masse chez des patients aux prises avec un mélanome (Hamid et al., 2013; Wolchok et al., 2013). Par contre, à notre connaissance, personne n'avait encore exploré l'action de la voie PD-1/PD-L1 dans un contexte de virothérapie oncolytique.

Il est maintenant bien connu que plusieurs cellules tumorales peuvent exprimer PD-L1, ce qui peut ainsi participer à leur immunoévasion (Okazaki and Honjo, 2007). Dans le modèle de mélanome murin B16, l'infection par le mutant de M augmente de beaucoup cette expression à la surface des cellules B16. Contre toute attente, nous avons également observé une augmentation significative de l'expression de PD-1 à la surface des cellules cancéreuses suite à l'infection par tous les virus. À première vue, ceci ne semble pas être d'une grande pertinence biologique pour la cellule tumorale. Toutefois, en considérant le microenvironnement tumoral et en considérant que les cellules T régulatrices de même que les MDSC peuvent aussi influencer la réponse immunitaire par la modulation de la voie PD-

1/PD-L1, nous avons bloqué à l'aide d'anticorps monoclonaux autant PD-1 que son ligand et avons déterminé que cela n'influence pas significativement le traitement par l'un ou l'autre des mutants du VSV. Bien que les niveaux de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ intratumoraux soient très élevés et que l'infection avec tous les mutants semble augmenter cette expression sur les lymphocytes spléniques, la cinétique de récolte de ces cellules après l'infection est assez précoce et peut donc corrélérer avec l'activation des cellules plus qu'avec leur épuisement. En effet, en contexte d'infection normale, PD-1 s'exprime suite à l'activation pour ensuite permettre une contraction de la réponse immunitaire. Un blocage de PD-1 ou PD-L1 pendant le traitement viral semble donc augmenter légèrement la réponse contre le virus, mais n'augmente toutefois pas significativement la réponse antitumorale. Dans certaines études telles que celles de Hamid *et al.* ou Wolchock *et al.*, le blocage a dû être soutenu sur plusieurs semaines et combiné avec un blocage de CTLA-4 pour être vraiment efficace. Le schéma thérapeutique utilisé dans notre modèle de virothérapie oncolytique était donc possiblement mal adapté et pourrait sûrement être optimisé.

Le système du complément limite la génération d'une réponse immunitaire antitumorale.

Toujours dans l'optique d'augmenter l'effet thérapeutique de l'oncolyse virale par les mutants du VSV, nous nous sommes attaqués à un facteur limitant la biodisponibilité du virus soit le système du complément. Ce dernier étant étroitement lié à la neutralisation du virus, d'autres études ont déjà relevé l'effet bénéfique d'inhiber certaines molécules du complément dans les traitements de virothérapie oncolytique (Magge *et al.*, 2013). Nous avons donc opté pour une décomplémentation totale, mais transitoire en utilisant du facteur de venin de cobra (CVF). Ce dernier agit en empêchant l'inhibiteur de la C3 convertase de limiter la réaction de clivage du C3 et épuise ainsi totalement la molécule centrale aux trois voies de la cascade du complément. Ceci nous permet alors d'analyser l'action du système du complément en entier sur la réponse immunitaire antitumorale sans avoir recours à des souris transgéniques (C3^{-/-} par exemple) dont l'architecture splénique est souvent altérée. Cette décomplémentation transitoire nous a permis d'avoir une disponibilité virale intratumorale un peu plus longue

puisque quelques virions infectieux ont pu être retrouvés dans la masse 4 jours suivant le dernier traitement, sans cependant s'étendre à la circulation sanguine ni à la rate (résultats non publiés). Ceci n'a toutefois pas généré une meilleure réponse gp33-spécifique indépendamment du mutant de VSV utilisé.

Nous avons néanmoins observé que le CVF seul permet l'établissement d'une réponse immunitaire antitumorale et avons décidé d'explorer ce phénomène. Une étude de Markiewski *et al.* a déjà démontré que l'anaphylatoxine C5a joue un rôle dans le développement du cancer en inhibant la réponse T CD8⁺ par l'amplification de la fonction immunosuppressive des MDSC (Markiewski *et al.*, 2008). Cependant, les auteurs n'ont pas regardé l'influence de cette molécule sur d'autres populations cellulaires. Dans le modèle de mélanome B16, la décomplémentation par le CVF a effectivement diminué les MDSC intratumoraux de même que spléniques. Par contre, de façon beaucoup plus importante, le traitement au CVF a fait augmenter la proportion de cellules NK pleinement fonctionnelles retrouvées dans la tumeur et la rate par rapport aux cellules immunitaires totales, sans toutefois influencer sur la proportion de cellules NKT (observation non publiée). De façon concomitante, une plus grande proportion de lymphocytes T CD8⁺ fonctionnels et spécifiques pour l'épitope tumoral gp33 a été générée en l'absence d'un système du complément opérationnel. Finalement, avec une déplétion des cellules NK, nous avons démontré que le contrôle tumoral observé suite au traitement par le CVF est relié à l'action du complément sur cette population cellulaire.

L'élimination de cellules apoptotiques peut se faire via leur opsonisation par la molécule du complément iC3b et la reconnaissance subséquente par le récepteur CR3 des cellules phagocytiques, phénomène souvent lié à la réduction de l'expression des facteurs de costimulation et à l'altération de la maturation des cellules dendritiques (Morelli *et al.*, 2003; Verbovetski *et al.*, 2002). Bien que la décomplémentation transitoire ne semble pas modifier la maturation de ces cellules présentatrices d'antigènes, une augmentation de la lyse des cellules tumorales par les cellules NK suite à l'action du CVF pourrait permettre une plus grande disponibilité d'antigènes et une meilleure présentation par les DCs dans des conditions où il y a peu d'inflammation et donc peut de signaux permettant l'activation

ultérieure des lymphocytes T (Walzer et al., 2005). Nous avons alors proposé comme modèle mécanistique que l'inhibition transitoire du système du complément permet une disponibilité systémique accrue des cellules NK de même qu'une augmentation de leur représentation par rapport à l'infiltrat immunitaire total (CD45⁺) au site tumoral. Cette population cellulaire participe donc à l'induction d'une réponse antitumorale par les CTL via, entre autres, la lyse des cellules cancéreuses et le relargage d'antigènes tumoraux. De plus, l'inhibition de certaines protéines du complément contribue à diminuer l'infiltration de MDSC pouvant promouvoir la suppression de cette réponse immunitaire.

L'ensemble de ces travaux suggère donc un lien fort entre la génération d'une réponse immunitaire antitumorale et le résultat final d'un combat contre le cancer. Les moyens d'induire une telle réponse sont diversifiés, mais tous ne sont encore que partiellement efficaces. Que ce soit la virothérapie oncolytique qui mise sur l'établissement d'un milieu pro-inflammatoire pour favoriser le bris de tolérance ou l'immunothérapie visant à bloquer les points de contrôle suppressifs de la réponse antitumorale, il reste encore beaucoup de travail à faire avant de savoir bien maîtriser l'environnement tumoral et ses effets systémiques.

CONCLUSION

Les travaux rapportés dans cette thèse avaient pour but de mieux comprendre les mécanismes permettant une immunomodulation thérapeutique dans un modèle de mélanome. Afin de potentialiser une réponse immunitaire antitumorale, nous avons décrit divers mutants du virus de la stomatite vésiculaire et déterminé leurs propriétés oncolytiques. Nous avons par la suite démontré leur impact réel dans l'induction d'une réponse immunitaire dirigée contre un épitope tumoral donné. Finalement, nous avons démontré qu'il était possible d'induire une immunomodulation thérapeutique par l'inhibition transitoire du système du complément.

En utilisant différents mutants du VSV comme outils oncolytiques, nous avons pu observer que des mutations dans la glycoprotéine d'enveloppe peuvent rendre le VSV capable d'induire la production d'interféron tout en étant aussi cytopathique que la souche parentale. Cela mène également à des cinétiques d'oncolyse et d'induction de l'apoptose distinctes dans les cellules murines de mélanome B16 selon le variant viral utilisé. Lorsque transposée dans le modèle *in vivo*, l'induction d'interféron influence peu l'efficacité des divers traitements. Nous avons toutefois démontré que le potentiel cytopathique des virus joue un rôle important dans la génération d'une réponse gp33-spécifique. Nous avons établi que l'étude de la réponse immunitaire dirigée contre un épitope tumoral étranger ne reflète pas toujours le potentiel thérapeutique réel d'un agent viral. Le mutant M_{M51R} illustre bien que malgré l'induction d'une faible réponse contre l'épitope gp33, ce dernier peut induire une réponse T CD8⁺ contre un groupe d'antigènes tumoraux plus diversifié. Ceci a d'ailleurs été démontré par le fait que le transfert de ces lymphocytes T cytotoxiques parvient à contrôler seul la croissance tumorale du mélanome ne présentant plus l'épitope gp33. À partir des résultats obtenus dans cette thèse, nous avons donc pu établir le modèle d'action suivant : Le virus, administré intratumoralement, est vite éliminé de l'organisme. Cela assure une certaine sécurité du traitement, mais limite en contrepartie la biodisponibilité du virus pour une lyse tumorale optimale. L'induction d'un environnement pro-inflammatoire médiée par la présence du virus permet la migration de cellules immunitaires au site tumoral. La balance entre une réponse immunitaire efficace ou suppressive est toutefois précaire puisqu'une augmentation de lymphocytes T CD8⁺ avec une diminution de Treg est également accompagnée d'une diminution de DCs et une augmentation de MDSC. Une présentation

antigénique est tout de même favorisée, quoi que faible, générant des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques et fonctionnels contre le gp33 pour les souches ayant une protéine de la matrice non mutée, et contre divers antigènes tumoraux pour le mutant de M. Ainsi, tous les traitements, bien qu'ayant des mécanismes effecteurs différents, permettent la prolongation de la survie des animaux (**Figure 7**).

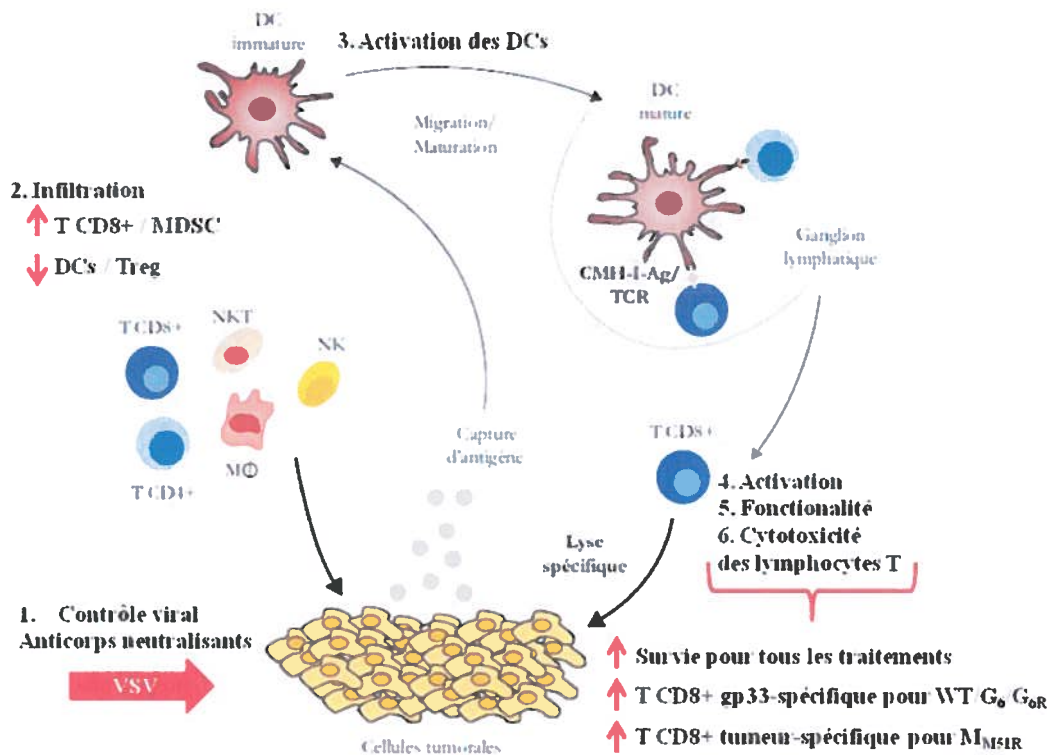


Figure 7. Récapitulation des mécanismes immunitaires engendrés par le traitement oncolytique à base des différents mutants de VSV. 1) Le VSV est rapidement contrôlé et éliminé par les anticorps neutralisants. 2) Une infiltration lymphocytaire suit l'infection virale. 3) Une activation de cellules présentatrices d'antigène doit avoir lieu, bien que sous la limite de détection, puisqu'une réponse immunitaire antitumorale est générée. 4) Cela mène à l'activation des lymphocytes T. 5-6) Des lymphocytes T CD8⁺ gp33-spécifiques fonctionnels et cytotoxiques sont induits pour les souches sauvage, G₆ et G_{6R}. La souche M_{M51R} induit peu de CTL contre l'épitope gp33, mais est tout de même efficace à induire des CTL antitumoraux. Cela entraîne la prolongation de la survie de tous les animaux traités. Adapté de (El Hage et al., 2008).

Les résultats rapportés dans cette thèse font donc la lumière sur les mécanismes immunitaires induits par le VSV et jusqu'ici peu caractérisés. Ils démontrent également qu'il

faudra faire preuve de prudence dans l'extrapolation de résultats concernant l'étude d'un seul épitope tumoral, comme nous l'a montré la réponse en CTL induite par M_{MS1R}. Ces travaux s'inscrivent également dans la longue lignée de développements en virothérapie oncolytique. De plus en plus, le courant de pensée change dans ce domaine pour se concentrer sur l'importance du système immunitaire dans ce type de thérapie. Cela ouvre également la porte aux combinaisons thérapeutiques. Nos travaux ont d'ailleurs démontré que, bien que n'influençant pas la virothérapie, le système du complément peut être une cible permettant une immunomodulation thérapeutique dans le modèle de mélanome. Cette thèse relate pour la première fois l'action d'une décomplémentation transitoire sur la biodisponibilité des cellules NK et la génération subséquente d'une réponse immunitaire antitumorale.

Mieux comprendre et caractériser les divers intervenants d'une réponse immunitaire antitumorale et trouver les bons outils permettant une immunomodulation efficace sera primordial afin de mieux combattre le cancer. Les virus utilisés comme adjuvants dynamiques pourront devenir des outils de traitements profitables. De plus, une combinaison de traitements agissant sur plusieurs intervenants immunologiques pourrait permettre la potentialisation d'un schéma thérapeutique attaquant cette terrible maladie sur plusieurs fronts.

RÉFÉRENCES

- Adair, R.A., Scott, K.J., Fraser, S., Errington-Mais, F., Pandha, H., Coffey, M., Selby, P., Cook, G.P., Vile, R., Harrington, K.J., *et al.* (2013). Cytotoxic and immune-mediated killing of human colorectal cancer by reovirus-loaded blood and liver mononuclear cells. *Int. J. Cancer* *132*, 2327-2338.
- Aguirre-Ghiso, J.A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nature Reviews Cancer* *7*, 834-846.
- Ahmed, M., and Lyles, D.S. (1998). Effect of Vesicular Stomatitis Virus matrix protein on transcription directed by host RNA polymerases I, II, and III. *J. Virol.* *72*, 8413-8419.
- Ahmed, M., McKenzie, M.O., Puckett, S., Hojnacki, M., Poliquin, L., and Lyles, D.S. (2003). Ability of the matrix protein of Vesicular Stomatitis Virus to suppress beta interferon gene expression is genetically correlated with the inhibition of host RNA and protein synthesis. *J. Virol.* *77*, 4646-4657.
- Ahmed, M., Mitchell, L.M., Puckett, S., Brzoza-Lewis, K.L., Lyles, D.S., and Hiltbold, E.M. (2009). Vesicular stomatitis virus M protein mutant stimulates maturation of Toll-like receptor 7 (TLR7)-positive dendritic cells through TLR-dependent and -independent mechanisms. *J. Virol.* *83*, 2962-2975.
- Ahmed, M., Puckett, S., and Lyles, D.S. (2010). Susceptibility of breast cancer cells to an oncolytic matrix (M) protein mutant of vesicular stomatitis virus. *Cancer Gene Ther.* *17*, 883-892.
- Albertini, A.A.V., Baquero, E., Ferlin, A., and Gaudin, Y. (2012). Molecular and cellular aspects of Rhabdovirus entry. *Viruses* *4*, 117-139.
- Allendorf, D.J., Yan, J., Ross, G.D., Hansen, R.D., Baran, J.T., Subbarao, K., Wang, L., and Haribabu, B. (2005). C5a-mediated leukotriene B4-amplified neutrophil chemotaxis is essential in tumor immunotherapy facilitated by anti-tumor monoclonal antibody and β -Glucan. *The Journal of Immunology* *174*, 7050-7056.
- Andersen, C., Jensen, T., Nansen, A., Marker, O., and Thomsen, A.R. (1999). CD4+ T cell-mediated protection against a lethal outcome of systemic infection with vesicular stomatitis virus requires CD40 ligand expression, but not IFN- γ or IL-4. *Int. Immunol.* *11*, 2035-2042.

- Andrejeva, J., Childs, K.S., Young, D.F., Carlos, T.S., Stock, N., Goodbourn, S., and Randall, R.E. (2004). The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN- β promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 17264-17269.
- Arase, N., Arase, H., Park, S.Y., Ohno, H., Ra, C., and Saito, T. (1997). Association with Fc γ R is essential for activation signal through NKR-P1 (CD161) in Natural Killer (NK) cells and NK1.1+ T cells. *The Journal of Experimental Medicine* *186*, 1957-1963.
- Arnheiter, H., Skuntz, S., Noteborn, M., Chang, S., and Meier, E. (1990). Transgenic mice with intracellular immunity to influenza virus. *Cell* *62*, 51-61.
- Au, W.C., Moore, P.A., Lowther, W., Juang, Y.T., and Pitha, P.M. (1995). Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *92*, 11657-11661.
- Baccala, R., Hoebe, K., Kono, D.H., Beutler, B., and Theofilopoulos, A.N. (2007). TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. *Nat. Med.* *13*, 543-551.
- Bachmann, M.F., Kalinke, U., Althage, A., Freer, G., Burkhardt, C., Roost, H.P., Aguet, M., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (1997). The role of antibody concentration and avidity in antiviral protection. *Science* *276*, 2024-2027.
- Badea, T., Niculescu, F., Soane, L., Fosbrink, M., Sorana, H., Rus, V., Shin, M.L., and Rus, H. (2002). RGC-32 increases p34CDC2 kinase activity and entry of aortic smooth muscle cells into S-phase. *J. Biol. Chem.* *277*, 502-508.
- Badea, T.C., Niculescu, F.I., Soane, L., Shin, M.L., and Rus, H. (1998). Molecular cloning and characterization of RGC-32, a novel gene induced by complement activation in oligodendrocytes. *J. Biol. Chem.* *273*, 26977-26981.
- Balachandran, S., and Barber, G.N. (2000). Vesicular stomatitis virus (VSV) therapy of tumors. *IUBMB Life* *50*, 135-138.
- Balachandran, S., and Barber, G.N. (2004). Defective translational control facilitates vesicular stomatitis virus oncolysis. *Cancer Cell* *5*, 51-65.
- Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet* *357*, 539-545.

- Barton, G.M. (2007). Viral recognition by Toll-like receptors. *Semin. Immunol.* *19*, 33-40.
- Bateman, A., Bullough, F., Murphy, S., Emiliusén, L., Lavillette, D., Cosset, F.-L., Cattaneo, R., Russell, S.J., and Vile, R.G. (2000). Fusogenic membrane glycoproteins as a novel class of genes for the local and immune-mediated control of tumor growth. *Cancer Res.* *60*, 1492-1497.
- Battcock, S.M., Collier, T.W., Zu, D., and Hirasawa, K. (2006). Negative regulation of the alpha interferon-induced antiviral response by the Ras/Raf/MEK pathway. *J. Virol.* *80*, 4422-4430.
- Beebe, D.P., and Cooper, N.R. (1981). Neutralization of vesicular stomatitis virus (VSV) by human complement requires a natural IgM antibody present in human serum. *J. Immunol.* *126*, 1562-1568.
- Bergmann, M., Romirer, I., Sachet, M., Fleischhacker, R., García-Sastre, A., Palese, P., Wolff, K., Pehamberger, H., Jakesz, R., and Muster, T. (2001). A genetically engineered Influenza A virus with ras-dependent oncolytic properties. *Cancer Res.* *61*, 8188-8193.
- Bierman, H. (1953). Remissions in leukemia of childhood following acute infectious disease: staphylococcus and streptococcus, varicella, and feline panleukopenia. *Cancer* *6*, 591-605.
- Bilsel, P.A., and Nichol, S.T. (1990). Polymerase errors accumulating during natural evolution of the glycoprotein gene of vesicular stomatitis virus Indiana serotype isolates. *J. Virol.* *64*, 4873-4883.
- Bilsel, P.A., Rowe, J.E., Fitch, W.M., and Nichol, S.T. (1990). Phosphoprotein and nucleocapsid protein evolution of vesicular stomatitis virus New Jersey. *J. Virol.* *64*, 2498-2504.
- Black, B.L., Rhodes, R.B., McKenzie, M., and Lyles, D.S. (1993). The role of vesicular stomatitis virus matrix protein in inhibition of host-directed gene expression is genetically separable from its function in virus assembly. *J. Virol.* *67*, 4814-4821.
- Blagosklonny, M.V., Li, C.J., and Pardee, A.B. (2012). Cell growth control and cancer. In *Cancer The outlaw cell*, R.E. LaFond, ed. (New York: Oxford University Press).
- Blondel, D., Harmison, G.G., and Schubert, M. (1990). Role of matrix protein in cytopathogenesis of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* *64*, 1716-1725.

- Bloom, M.B., Perry-Lalley, D., Robbins, P.F., Li, Y., El-Gamil, M., Rosenberg, S.A., and Yang, J.C. (1997). Identification of tyrosinase-related protein 2 as a tumor rejection antigen for the B16 melanoma. *The Journal of Experimental Medicine* 185, 453-460.
- Bluming, A., and Ziegler, J. (1971). Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection. *The Lancet* 2, 105-106.
- Boehme, K.W., and Compton, T. (2004). Innate Sensing of Viruses by Toll-Like Receptors. *J. Virol.* 78, 7867-7873.
- Bordoli, L., Kiefer, F., Arnold, K., Benkert, P., Battey, J., and Schwede, T. (2008). Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nat. Protocols* 4, 1-13.
- Braxton, C.L., Puckett, S.H., Mizel, S.B., and Lyles, D.S. (2010). Protection against lethal Vaccinia Virus challenge by using an attenuated matrix protein mutant Vesicular Stomatitis Virus vaccine vector expressing poxvirus antigens. *J. Virol.* 84, 3552-3561.
- Breitbach, C.J., Burke, J., Jonker, D., Stephenson, J., Haas, A.R., Chow, L.Q.M., Nieva, J., Hwang, T.-H., Moon, A., Patt, R., *et al.* (2011). Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans. *Nature* 477, 99-102.
- Bridle, B.W., Stephenson, K.B., Boudreau, J.E., Koshy, S., Kazhdan, N., Pullenayegum, E., Brunelliere, J., Bramson, J.L., Lichty, B.D., and Wan, Y. (2010). Potentiating cancer immunotherapy using an oncolytic virus. *Mol. Ther.* 18, 1430-1439.
- Brutkiewicz, R.R., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., and Bendelac, A. (1995). TAP-independent, beta 2-microglobulin-dependent surface expression of functional mouse CD1.1. *The Journal of Experimental Medicine* 182, 1913-1919.
- Bubeck, D., Roversi, P., Donev, R., Morgan, B.P., Llorca, O., and Lea, S.M. (2011). Structure of human complement C8, a precursor to membrane attack. *J. Mol. Biol.* 405, 325-330.
- Buchmeier, M.J., and Oldstone, M.B.A. (1978). Virus-induced immune complex disease: Identification of specific viral antigens and antibodies deposited in complexes during chronic lymphocytic choriomeningitis virus infection. *The Journal of Immunology* 120, 1297-1304.

- Burek, M., Maddika, S., Burek, C.J., Daniel, P.T., Schulze-Osthoff, K., and Los, M. (2005). Apoptin-induced cell death is modulated by Bcl-2 family members and is Apaf-1 dependent. *Oncogene* 25, 2213-2222.
- Burnet, M. (1957). Cancer—A biological approach. *BMJ* 1.
- Burns, W.H., Billups, L.C., and Notkins, A.L. (1975). Thymus dependence of viral antigens. *256* 5519.
- Calabi, F., and Bradbury, A. (1991). The CD1 system. *Tissue Antigens* 37, 1-9.
- Campisi, J. (2005). Suppressing cancer: the importance of being senescent. *Science* 309, 886-887.
- Caron, E., and Hall, A. (1998). Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282, 1717-1721.
- Carroll, M.C. (1998). The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 545-568.
- Cerwenka, A., and Lanier, L.L. (2001). Natural killer cells, viruses and cancer. *Nature Reviews Immunology* 1, 41-49.
- Chambers, A.F., Groom, A.C., and MacDonald, I.C. (2002). Metastasis: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer* 2, 563-572.
- Chan, D.C., and Kim, P.S. (1998). HIV entry and its inhibition. *Cell* 93, 681-684.
- Chang, G., Xu, S., Watanabe, M., Jayakar, H.R., Whitt, M.A., and Gingrich, J.R. (2010). Enhanced oncolytic activity of vesicular stomatitis virus encoding SV5-F protein against prostate cancer. *J. Urol.* 183, 1611-1618.
- Charan, S., and Zinkernagel, R.M. (1986). Antibody mediated suppression of secondary IgM response in nude mice against vesicular stomatitis virus. *The Journal of Immunology* 136, 3057-3061.
- Chiocca, E.A. (2008). The host response to cancer virotherapy. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 10, 38-45.
- Cobleigh, M.A., Buonocore, L., Uprichard, S.L., Rose, J.K., and Robek, M.D. (2010). A Vesicular Stomatitis Virus-based Hepatitis B Virus vaccine vector provides protection against challenge in a single dose. *J. Virol.* 84, 7513-7522.
- Coffey, M.C., Strong, J.E., Forsyth, P.A., and Lee, P.W.K. (1998). Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science* 282, 1332-1334.

- Condeelis, J., and Pollard, J.W. (2006). Macrophages: Obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124, 263-266.
- Connor, J.H., and Lyles, D.S. (2002). Vesicular Stomatitis Virus Infection Alters the eIF4F Translation Initiation Complex and Causes Dephosphorylation of the eIF4E Binding Protein 4E-BP1. *J. Virol.* 76, 10177-10187.
- Connor, J.H., Naczki, C., Koumenis, C., and Lyles, D.S. (2004). Replication and cytopathic effect of oncolytic Vesicular Stomatitis Virus in hypoxic tumor cells in vitro and in vivo. *J. Virol.* 78, 8960-8970.
- Corradetti, M.N., and Guan, K.-L. (2006). Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? *Oncogene* 25, 6347-6360.
- Cummings, K.L., Waggoner, S.N., Tacke, R., and Hahn, Y.S. (2007). Role of complement in immune regulation and its exploitation by virus. *Viral Immunol.* 20, 505-524.
- Cureton, D.K., Massol, R.H., Saffarian, S., Kirchhausen, T.L., and Whelan, S.P.J. (2009). Vesicular Stomatitis Virus enters cells through vesicles incompletely coated with clathrin that depend upon actin for internalization. *PLoS Pathog.* 5, e1000394.
- Dancho, B., McKenzie, M.O., Connor, J.H., and Lyles, D.S. (2009). Vesicular stomatitis virus matrix protein mutations that affect association with host membranes and viral nucleocapsids. *The Journal of Biological Chemistry* 284, 4500-4509.
- Davies, A., Simmons, D.L., Hale, G., Harrison, R.A., Tighe, H., Lachmann, P.J., and Waldmann, H. (1989). CD59, an LY-6-like protein expressed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex on homologous cells. *The Journal of Experimental Medicine* 170, 637-654.
- de Veer, M.J., Holko, M., Frevel, M., Walker, E., Der, S., Paranjape, J.M., Silverman, R.H., and Williams, B.R.G. (2001). Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J. Leukoc. Biol.* 69, 912-920.
- de Visser, K.E., Eichten, A., and Coussens, L.M. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews Cancer* 6, 24-37.
- Dembinski, J.L., Spaeth, E.L., Fueyo, J., Gomez-Manzano, C., Studeny, M., Andreeff, M., and Marini, F.C. (2010). Reduction of nontarget infection and systemic toxicity by targeted delivery of conditionally replicating viruses transported in mesenchymal stem cells. *Cancer Gene Ther.* 17, 289-297.

- DePace, N. (1912). Sulla Scomparsa di un enorme cancro begetante del collo dell'utero senza cura chirurgica [Italian]. *Ginecologia* 9.
- DePolo, N.J., Reed, J.D., Sheridan, P.L., Townsend, K., Sauter, S.L., Jolly, D.J., and Dubensky Jr., T.W. (2000). VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human serum. *Mol. Ther.* 2, 218-222.
- Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R.G., and Silverman, R.H. (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon α , β , or γ using oligonucleotide arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 15623-15628.
- Derynck, R., Akhurst, R.J., and Balmain, A. (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat. Genet.* 29, 117-129.
- Derynck, R., Goeddel, D.V., Ullrich, A., Gutterman, J.U., Williams, R.D., Bringman, T.S., and Berger, W.H. (1987). Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors α and β and the epidermal growth factor receptor by human tumors. *Cancer Res.* 47, 707-712.
- Desforges, M., Charron, J., Berard, S., Beausoleil, S., Stojdl, D.F., Despars, G., Laverdiere, B., Bell, J.C., Talbot, P.J., Stanners, C.P., and Poliquin, L. (2001). Different host-cell shutoff strategies related to the matrix protein lead to persistence of vesicular stomatitis virus mutants on fibroblast cells. *Virus Res.* 76, 87-102.
- Desforges, M., Despars, G., Berard, S., Gosselin, M., McKenzie, M.O., Lyles, D.S., Talbot, P.J., and Poliquin, L. (2002). Matrix protein mutations contribute to inefficient induction of apoptosis leading to persistent infection of human neural cells by vesicular stomatitis virus. *Virology* 295, 63-73.
- Diaz, R.M., Galivo, F., Kottke, T., Wongthida, P., Qiao, J., Thompson, J., Valdes, M., Barber, G., and Vile, R.G. (2007). Oncolytic immunovirotherapy for melanoma using vesicular stomatitis virus. *Cancer Res.* 67, 2840-2848.
- Dickson, R.B., Kasid, A., Huff, K.K., Bates, S.E., Knabbe, C., Bronzert, D., Gelmann, E.P., and Lippman, M.E. (1987). Activation of growth factor secretion in tumorigenic states of breast cancer induced by 17 beta-estradiol or v-Ha-ras oncogene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84, 837-841.

- Ditzel, H.J., Itoh, K., and Burton, D.R. (1996). Determinants of polyreactivity in a large panel of recombinant human antibodies from HIV-1 infection. *The Journal of Immunology* *157*, 739-749.
- Dock, G. (1904). Influence of complicating diseases upon leukemia. *Am. J. Med. Sci.* *127*, 563-592.
- Donin, N., Jurianz, K., Ziporen, L., Schultz, S., Kirschfink, M., and Fishelson, Z. (2003). Complement resistance of human carcinoma cells depends on membrane regulatory proteins, protein kinases and sialic acid. *Clinical & Experimental Immunology* *131*, 254-263.
- Doronin, K., Shashkova, E.V., May, S.M., Hofherr, S.E., and Barry, M.A. (2009). Chemical modification with high molecular weight polyethylene glycol reduces transduction of hepatocytes and increases efficacy of intravenously delivered oncolytic Adenovirus. *Hum. Gene Ther.* *20*, 975-988.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* *3*, 991-998.
- El Hage, F., Abouzahr-Rifai, S., Meslin, F., Mami-Chouaib, F., and Chouaib, S. (2008). Réponse immune et cancer. *Bull. Cancer (Paris)* *95*, 57-67.
- Elvington, M., Huang, Y., Morgan, B.P., Qiao, F., van Rooijen, N., Atkinson, C., and Tomlinson, S. (2012). A targeted complement-dependent strategy to improve the outcome of mAb therapy, and characterization in a murine model of metastatic cancer. *Blood* *119*, 6043-6051.
- Emini, E.A., Kao, S.Y., Lewis, A.J., Crainic, R., and Wimmer, E. (1983). Functional basis of poliovirus neutralization determined with monospecific neutralizing antibodies. *J. Virol.* *46*, 466-474.
- Eriksson, M., Guse, K., Bauerschmitz, G., Virkkunen, P., Tarkkanen, M., Tanner, M., Hakkarainen, T., Kanerva, A., Desmond, R.A., Pesonen, S., and Hemminki, A. (2007). Oncolytic adenoviruses kill breast cancer initiating CD44+CD24-/Low cells. *Mol. Ther.* *15*, 2088-2093.
- Eyles, J., Puaux, A.-L., Wang, X., Toh, B., Prakash, C., Hong, M., Tan, T.G., Zheng, L., Ong, L.C., Jin, Y., *et al.* (2010). Tumor cells disseminate early, but

- immunosurveillance limits metastatic outgrowth, in a mouse model of melanoma. *The Journal of Clinical Investigation* *120*, 2030-2039.
- Fantin, A., Vieira, J.M., Gestri, G., Denti, L., Schwarz, Q., Prykhozhij, S., Peri, F., Wilson, S.W., and Ruhrberg, C. (2010). Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* *116*, 829-840.
- Fernandez, M., Porosnicu, M., Markovic, D., and Barber, G.N. (2002). Genetically Engineered Vesicular Stomatitis Virus in Gene Therapy: Application for Treatment of Malignant Disease. *J. Virol.* *76*, 895-904.
- Fernandez, N.C., Lozier, A., Flament, C., Ricciardi-Castagnoli, P., Bellet, D., Suter, M., Perricaudet, M., Tursz, T., Maraskovsky, E., and Zitvogel, L. (1999). Dendritic cells directly trigger NK cell functions: Cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat. Med.* *5*, 405-411.
- Ferran, M., and Lucas-Lenard, J. (1997). The vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits transcription from the human beta interferon promoter. *J. Virol.* *71*, 371-377.
- Fidler, I.J. (1970). Metastasis: Quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125I-5-Iodo-2'-deoxyuridine. *J. Natl. Cancer Inst.* *45*, 773-782.
- Fields, B.N., and Hawkins, K. (1967). Human infection with the virus of Vesicular Stomatitis during an epizootic. *N. Engl. J. Med.* *277*, 989-994.
- Finkelshtein, D., Werman, A., Novick, D., Barak, S., and Rubinstein, M. (2013). LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *110*, 7306-7311.
- Fishelson, Z., Donin, N., Zell, S., Schultz, S., and Kirschfink, M. (2003). Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. *Mol. Immunol.* *40*, 109-123.
- Fitzgerald, K.A., McWhirter, S.M., Faia, K.L., Rowe, D.C., Latz, E., Golenbock, D.T., Coyle, A.J., Liao, S.-M., and Maniatis, T. (2003). IKK[epsilon] and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* *4*, 491-496.
- Fleury, D., Barrere, B., Bizebard, T., Daniels, R.S., Skehel, J.J., and Knossow, M. (1999). A complex of influenza hemagglutinin with a neutralizing antibody that binds outside the virus receptor binding site. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *6*, 530-534.

- Flood, E.A., McKenzie, M.O., and Lyles, D.S. (2000). Role of M Protein aggregation in defective assembly of temperature-sensitive M protein mutants of Vesicular Stomatitis Virus. *Virology* 278, 520-533.
- Fosbrink, M., Cudrici, C., Niculescu, F., Badea, T.C., David, S., Shamsuddin, A., Shin, M.L., and Rus, H. (2005). Overexpression of RGC-32 in colon cancer and other tumors. *Exp. Mol. Pathol.* 78, 116-122.
- Franco, O.E., and Hayward, S.W. (2012). Chapter Nine - Targeting the tumor stroma as a novel therapeutic approach for prostate cancer. In *Adv. Pharmacol.*, S.M.S. Keiran, ed. (Academic Press), pp. 267-313.
- Francoeur, A.M., Lam, T., and Stanners, C.P. (1980). PIF, a highly sensitive plaque assay for the induction of interferon. *Virology* 105, 526-536.
- Francoeur, A.M., Poliquin, L., and Stanners, C.P. (1987). The isolation of interferon-inducing mutants of vesicular stomatitis virus with altered viral P function for the inhibition of total protein synthesis. *Virology* 160, 236-245.
- Francoz, S., Mathiaux, J., and Dubus, P. (2012). Modèles précliniques chez le rongeur de carcinomes pulmonaires. *Bull. Cancer (Paris)* 99, 1017-1027.
- Frank, A., Pimkina, J., and Murphy, M.E. (2012). Tumor suppressor genes. In *Cancer The outlaw cell*, R.E. LaFond, ed. (New York: Oxford University Press).
- Frank, M.M., and Fries, L.F. (1991). The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol. Today* 12, 322-326.
- Fritzinger, D.C., Hew, B.E., Thorne, M., Pangburn, M.K., Janssen, B.J.C., Gros, P., and Vogel, C.-W. (2009). Functional characterization of human C3/cobra venom factor hybrid proteins for therapeutic complement depletion. *Developmental & Comparative Immunology* 33, 105-116.
- Fu, X., and Zhang, X. (2002). Potent systemic antitumor activity from an oncolytic Herpes Simplex Virus of syncytial phenotype. *Cancer Res.* 62, 2306-2312.
- Fueyo, J., Gomez-Manzano, C., Alemany, R., Lee, P.S., McDonnell, T.J., Mitlianga, P., Shi, Y.-X., Levin, V., Yung, A.W., and Kyritsis, A.P. (2000). A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene* 19, 2-12.

- Fulci, G., Breyman, L., Gianni, D., Kurozumi, K., Rhee, S.S., Yu, J., Kaur, B., Louis, D.N., Weissleder, R., Caligiuri, M.A., and Chiocca, E.A. (2006). Cyclophosphamide enhances glioma virotherapy by inhibiting innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *103*, 12873-12878.
- Gabrilovich, D.I., Bronte, V., Chen, S.-H., Colombo, M.P., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., and Schreiber, H. (2007). The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* *67*, 425.
- Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 162-174.
- Galanis, E., Hartmann, L.C., Cliby, W.A., Long, H.J., Peethambaram, P.P., Barrette, B.A., Kaur, J.S., Haluska, P.J., Aderca, I., Zollman, P.J., *et al.* (2010). Phase I Trial of Intraperitoneal Administration of an Oncolytic Measles Virus Strain Engineered to Express Carcinoembryonic Antigen for Recurrent Ovarian Cancer. *Cancer Res.* *70*, 875-882.
- Galanis, E., Markovic, S.N., Suman, V.J., Nuovo, G.J., Vile, R.G., Kottke, T.J., Nevala, W.K., Thompson, M.A., Lewis, J.E., Rumilla, K.M., *et al.* (2012). Phase II trial of intravenous administration of Reolysin[reg] (Reovirus serotype-3-dearing strain) in patients with metastatic melanoma. *Mol. Ther.* *20*, 1998-2003.
- Galivo, F., Diaz, R.M., Wongthida, P., Thompson, J., Kottke, T., Barber, G., Melcher, A., and Vile, R. (2009). Single-cycle viral gene expression, rather than progressive replication and oncolysis, is required for VSV therapy of B16 melanoma. *Gene Ther.* *17*, 158-170.
- Galivo, F., Diaz, R.M., Wongthida, P., Thompson, J., Kottke, T., Barber, G., Melcher, A., and Vile, R. (2010). Single-cycle viral gene expression, rather than progressive replication and oncolysis, is required for VSV therapy of B16 melanoma. *Gene Ther.* *17*, 158-170.
- Gallina, G., Dolcetti, L., Serafini, P., Santo, C.D., Marigo, I., Colombo, M.P., Basso, G., Brombacher, F., Borrello, I., Zanovello, P., *et al.* (2006). Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8⁺ T cells. *The Journal of Clinical Investigation* *116*, 2777-2790.

- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., *et al.* (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960-1964.
- Ganly, I., Kirn, D., Eckhardt, S.G., Rodriguez, G.I., Soutar, D.S., Otto, R., Robertson, A.G., Park, O., Gulley, M.L., Heise, C., *et al.* (2000). A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer. *Clin. Cancer Res.* 6, 798-806.
- Gao, Y., Whitaker-Dowling, P., Griffin, J.A., Barmada, M.A., and Bergman, I. (2009). Recombinant vesicular stomatitis virus targeted to Her2/neu combined with anti-CTLA4 antibody eliminates implanted mammary tumors. *Cancer Gene Ther.* 16, 44-52.
- Garber, K. (2006). China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *J. Natl. Cancer Inst.* 98, 298-300.
- Garcia-Sastre, A., and Biron, C.A. (2006). Type 1 interferons and the virus-host relationship: A lesson in detente. *Science* 312, 879-882.
- García, M.A., Gil, J., Ventoso, I., Guerra, S., Domingo, E., Rivas, C., and Esteban, M. (2006). Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 1032-1060.
- Gardiner, D., Lalezari, J., Lawitz, E., DiMicco, M., Ghalib, R., Reddy, K.R., Chang, K.-M., Sulkowski, M., Marro, S.O., Anderson, J., *et al.* (2013). A randomized, double-blind, placebo-controlled assessment of BMS-936558, a fully human monoclonal antibody to programmed death-1 (PD-1), in patients with chronic Hepatitis C virus infection. *PLoS ONE* 8, e63818.
- Gaudreault, E., Fiola, S., Olivier, M., and Gosselin, J. (2007). Epstein-Barr virus induces MCP-1 secretion by human monocytes via TLR2. *J. Virol.* 81, 8016-8024.
- Ge, P., Tsao, J., Schein, S., Green, T.J., Luo, M., and Zhou, Z.H. (2010). Cryo-EM model of the bullet-shaped vesicular stomatitis virus. *Science* 327, 689-693.
- Geisbert, T.W., Bausch, D.G., and Feldmann, H. (2010). Prospects for immunisation against Marburg and Ebola viruses. *Rev. Med. Virol.* 20, 344-357.
- Gelderman, K.A., Kuppen, P.J.K., Bruin, W., Fleuren, G.J., and Gorter, A. (2002). Enhancement of the complement activating capacity of 17-1A mAb to overcome the

- effect of membrane-bound complement regulatory proteins on colorectal carcinoma. *Eur. J. Immunol.* *32*, 128-135.
- Gelderman, K.A., Tomlinson, S., Ross, G.D., and Gorter, A. (2004). Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. *Trends Immunol.* *25*, 158-164.
- Génin, P., Lin, R., Hiscott, J., and Civas, A. (2012). Recruitment of histone deacetylase 3 to the interferon-A gene promoters attenuates interferon expression. *PLoS ONE* *7*, e38336.
- Geogerger, B., Grill, J., Opolon, P., Morizet, J., Aubert, G., Terrier-Lacombe, M.-J., Bressac de-Paillerets, B., Barrois, M., Feunteun, J., Kirn, D.H., and Vassal, G. (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.
- Georgel, P., Jiang, Z., Kunz, S., Janssen, E., Mols, J., Hoebe, K., Bahram, S., Oldstone, M.B.A., and Beutler, B. (2007). Vesicular stomatitis virus glycoprotein G activates a specific antiviral Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Virology* *362*, 304-313.
- Gionanlis, L., Alexopoulos, E., Papagianni, A., Leontsini, M., and Memmos, D. (2008). Fibrotic mechanisms in idiopathic rapidly progressive glomerulonephritis: The role of TGF- β 1 and C5b-9. *Ren. Fail.* *30*, 239-246.
- Glodowski, D.R., Petersen, J.M., and Dahlberg, J.E. (2002). Complex nuclear localization signals in the matrix protein of Vesicular Stomatitis Virus. *J. Biol. Chem.* *277*, 46864-46870.
- Gongora, C., and Mechti, N. (1999). L'interféron : un mécanisme complexe de signalisation. *Bull. Cancer (Paris)* *86*, 911-919.
- Goswami, S., Sahai, E., Wyckoff, J.B., Cammer, M., Cox, D., Pixley, F.J., Stanley, E.R., Segall, J.E., and Condeelis, J.S. (2005). Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Res.* *65*, 5278-5283.
- Gowda, D.C., Petrella, E.C., Raj, T.T., Bredehorst, R., and Vogel, C.W. (1994). Immunoreactivity and function of oligosaccharides in cobra venom factor. *The Journal of Immunology* *152*, 2977-2986.
- Greentree, L. (1983). Hodgkin's disease: therapeutic role of measles vaccine. *American journal of medicine* *75*.

- Gross, B. (1971). Measles and leukaemia. *The Lancet* *1*, 397-398.
- Grossardt, C., Engeland, C.E., Bossow, S., Halama, N., Zaoui, K., Leber, M.F., Springfield, C., Jaeger, D., von Kalle, C., and Ungerechts, G. (2013). GM-CSF-armed oncolytic measles virus is an effective therapeutic cancer vaccine. *Hum. Gene Ther.*
- Grote, D., Russell, S.J., Cornu, T.I., Cattaneo, R., Vile, R., Poland, G.A., and Fielding, A.K. (2001). Live attenuated measles virus induces regression of human lymphoma xenografts in immunodeficient mice. *Blood* *97*, 3746-3754.
- Grupe, A., Germer, S., Usuka, J., Aud, D., Belknap, J.K., Klein, R.F., Ahluwalia, M.K., Higuchi, R., and Peltz, G. (2001). In silico mapping of complex disease-related traits in mice. *Science* *292*, 1915-1918.
- Guerra, N., Tan, Y.X., Joncker, N.T., Choy, A., Gallardo, F., Xiong, N., Knoblauch, S., Cado, D., Greenberg, N.R., and Raulet, D.H. (2008). NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* *28*, 571-580.
- Guo, Z.S., Thorne, S.H., and Bartlett, D.L. (2008). Oncolytic virotherapy: Molecular targets in tumor-selective replication and carrier cell-mediated delivery of oncolytic viruses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* *1785*, 217-231.
- Hadaschik, B.A., Zhang, K., So, A.I., Fazli, L., Jia, W., Bell, J.C., Gleave, M.E., and Rennie, P.S. (2008). Oncolytic Vesicular Stomatitis Viruses are potent agents for intravesical treatment of high-risk bladder cancer. *Cancer Res.* *68*, 4506-4510.
- Hall, K., Scott, K.J., Rose, A., Desborough, M., Harrington, K., Pandha, H., Parrish, C., Vile, R., Coffey, M., Bowen, D., *et al.* (2012). Reovirus-mediated cytotoxicity and enhancement of innate immune responses against acute myeloid leukemia. *BioResearch Open Access* *1*, 3-15.
- Haller, O., and Kochs, G. (2002). Interferon-induced Mx proteins: Dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic* *3*, 710-717.
- Hamid, O., Robert, C., Daud, A., Hodi, F.S., Hwu, W.-J., Kefford, R., Wolchok, J.D., Hersey, P., Joseph, R.W., Weber, J.S., *et al.* (2013). Safety and Tumor Responses with Lembroizumab (Anti-PD-1) in Melanoma. *N. Engl. J. Med.*
- Hansen, R., and Libnoch, J. (1978). Remission of chronic lymphocytic leukemia after smallpox vaccination. *Arch. Intern. Med.* *138*, 1137-1138.

- Harley, C.B., Futcher, A.B., and Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460.
- Hayashi, N., and Cunha, G.R. (1991). Mesenchyme-induced changes in the neoplastic characteristics of the dunning prostatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 51, 4924-4930.
- Heise, C., Hermiston, T., Johnson, L., Brooks, G., Sampson-Johannes, A., Williams, A., Hawkins, L., and Kim, D. (2000). An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nat. Med.* 6, 1134-1139.
- Heo, J., Reid, T., Ruo, L., Breitbart, C.J., Rose, S., Bloomston, M., Cho, M., Lim, H.Y., Chung, H.C., Kim, C.W., *et al.* (2013). Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer. *Nat. Med.*
- Higuchi, H., Bronk, S.F., Bateman, A., Harrington, K., Vile, R.G., and Gores, G.J. (2000). Viral fusogenic membrane glycoprotein expression causes syncytia formation with bioenergetic cell death: Implications for gene therapy. *Cancer Res.* 60, 6396-6402.
- Hiscott, J. (2007). Triggering the innate antiviral response through IRF-3 activation. *J. Biol. Chem.* 282, 15325-15329.
- Hiscott, J., Grandvaux, N., Sharma, S., Tenoever, B.R., Servant, M.J., and Lin, R. (2003). Convergence of the NF- κ B and interferon signaling pathways in the regulation of antiviral defense and apoptosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1010, 237-248.
- Hoffmann, M., Wu, Y.-J., Gerber, M., Berger-Rentsch, M., Heimrich, B., Schwemmler, M., and Zimmer, G. (2010). Fusion-active glycoprotein G mediates the cytotoxicity of vesicular stomatitis virus M mutants lacking host shut-off activity. *J. Gen. Virol.* 91, 2782-2793.
- Holzinger, D., Jorns, C., Stertz, S., Boisson-Dupuis, S., Thimme, R., Weidmann, M., Casanova, J.-L., Haller, O., and Kochs, G. (2007). Induction of MxA gene expression by Influenza A virus requires type I or type III interferon signaling. *J. Virol.* 81, 7776-7785.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzózka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.-K., Schlee, M., *et al.* (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314, 994-997.

- Huang, T.G., Ebert, O., Shinozaki, K., Garcia-Sastre, A., and Woo, S.L. (2003). Oncolysis of hepatic metastasis of colorectal cancer by recombinant vesicular stomatitis virus in immune-competent mice. *Mol. Ther.* *8*, 434-440.
- Huang, W.-Y., Li, Z.-G., Rus, H., Wang, X., Jose, P.A., and Chen, S.-Y. (2009). RGC-32 mediates transforming growth factor- β -induced epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubular cells. *J. Biol. Chem.* *284*, 9426-9432.
- Hwang, R.F., Moore, T., Arumugam, T., Ramachandran, V., Amos, K.D., Rivera, A., Ji, B., Evans, D.B., and Logsdon, C.D. (2008). Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res.* *68*, 918-926.
- Janelle, V., Brassard, F., Lapierre, P., Lamarre, A., and Poliquin, L. (2011). Mutations in the glycoprotein of Vesicular Stomatitis Virus affect cytopathogenicity: Potential for oncolytic virotherapy. *J. Virol.* *85*, 6513-6520.
- Janelle, V., Poliquin, L., and Lamarre, A. (2013). Le virus de la stomatite vésiculaire dans la lutte contre le cancer. *Med Sci (Paris)* *29*, 175-182.
- Jayakar, H.R., Jeetendra, E., and Whitt, M.A. (2004). Rhabdovirus assembly and budding. *Virus Res.* *106*, 117-132.
- Jiang, H., McCormick, F., Lang, F.F., Gomez-Manzano, C., and Fueyo, J. (2006). Oncolytic adenoviruses as antiglioma agents. *Expert Rev. Anticancer Ther.* *6*, 697-708.
- Johansson, A.-C., Ansell, A., Jerhammar, F., Lindh, M.B., Grénman, R., Munck-Wikland, E., Östman, A., and Roberg, K. (2012). Cancer-associated fibroblasts induce matrix metalloproteinase-mediated cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Mol. Cancer Res.* *10*, 1158-1168.
- Johnson, J.B., Lyles, D.S., Alexander-Miller, M.A., and Parks, G.D. (2012). Virion-associated complement regulator CD55 is more potent than CD46 in mediating resistance of mumps virus and Vesicular Stomatitis Virus to neutralization. *J. Virol.* *86*, 9929-9940.
- Johnson, K.M., Vogel, J.E., and Peralta, P.H. (1966). Clinical and serological response to laboratory-acquired human infection by Indiana type Vesicular Stomatitis Virus (VSV). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* *15*, 244-246.

- Jones, D.S., Reichardt, P., Ford, M.L., Edwards, L.J., and Evavold, B.D. (2008). TCR antagonism by peptide requires high TCR expression. *The Journal of Immunology* *181*, 1760-1766.
- Joyce, J.A., and Pollard, J.W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature Reviews Cancer* *9*, 239-252.
- Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G.-I., De los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F., *et al.* (2002). In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* *17*, 211-220.
- Jurianz, K., Ziegler, S., Garcia-Schüler, H., Kraus, S., Bohana-Kashtan, O., Fishelson, Z., and Kirschfink, M. (1999). Complement resistance of tumor cells: basal and induced mechanisms. *Mol. Immunol.* *36*, 929-939.
- Kalinke, U., Bucher, E.M., Ernst, B., Oxenius, A., Roost, H.-P., Geley, S., Kofler, R., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1996). The Role of Somatic Mutation in the Generation of the Protective Humoral Immune Response against Vesicular Stomatitis Virus. *Immunity* *5*, 639-652.
- Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (1998). Demonstration of an interferon γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *95*, 7556-7561.
- Karin, M., Cao, Y., Greten, F.R., and Li, Z.-W. (2002). NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature Reviews Cancer* *2*, 301-310.
- Karnoub, A.E., Dash, A.B., Vo, A.P., Sullivan, A., Brooks, M.W., Bell, G.W., Richardson, A.L., Polyak, K., Tubo, R., and Weinberg, R.A. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* *449*, 557-563.
- Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* *26*, 677-704.
- Kelly, E.J., Nace, R., Barber, G.N., and Russell, S.J. (2010). Attenuation of Vesicular Stomatitis Virus encephalitis through microRNA targeting. *J. Virol.* *84*, 1550-1562.
- Kemper, C., Atkinson, J.P., and Hourcade, D.E. (2010). Properdin: Emerging roles of a pattern-recognition molecule. *Annu. Rev. Immunol.* *28*, 131-155.

- Khong, H.T., and Restifo, N.P. (2002). Natural selection of tumor variants in the generation of tumor escape phenotypes. *Nat. Immunol.* 3, 999-1005.
- Kim, H., Meyer, K., Di Bisceglie, A.M., and Ray, R. (2013). Hepatitis C virus suppresses C9 complement synthesis and impairs membrane attack complex function. *J. Virol.* 87, 5858-5867.
- Kim, J.H., Oh, J.Y., Park, B.H., Lee, D.E., Kim, J.S., Park, H.E., Roh, M.S., Je, J.E., Yoon, J.H., Thorne, S.H., *et al.* (2006). Systemic armed oncolytic and immunologic therapy for cancer with JX-594, a targeted poxvirus expressing GM-CSF. *Mol. Ther.* 14, 361-370.
- Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L., and Shay, J.W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011-2015.
- Kinoshita, T. (1991). Biology of complement: the overture. *Immunol. Today* 12, 291-295.
- Kishore, U., and Reid, K.B.M. (2000). C1q: Structure, function, and receptors. *Immunopharmacology* 49, 159-170.
- Kohl, J. (2006). Drug evaluation: the C5a receptor antagonist PMX-53. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 8, 529-538.
- Kojima, Y., Acar, A., Eaton, E.N., Mellody, K.T., Scheel, C., Ben-Porath, I., Onder, T.T., Wang, Z.C., Richardson, A.L., Weinberg, R.A., and Orimo, A. (2010). Autocrine TGF- β and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 20009-20014.
- Kölmel, K.F., Grange, J.M., Krone, B., Mastrangelo, G., Rossi, C.R., Henz, B.M., Seebacher, C., Botev, I.N., Niin, M., Lambert, D., *et al.* (2005). Prior immunisation of patients with malignant melanoma with vaccinia or BCG is associated with better survival. An European Organization for Research and Treatment of Cancer cohort study on 542 patients. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 41, 118-125.
- Kopecky, S.A., and Lyles, D.S. (2003a). The cell-rounding activity of the Vesicular Stomatitis Virus matrix protein is due to the induction of cell death. *J. Virol. Vol.* 77, No. 9, 5524-5528.

- Kopecky, S.A., and Lyles, D.S. (2003b). Contrasting effects of matrix protein on apoptosis in HeLa and BHK cells infected with Vesicular Stomatitis Virus are due to inhibition of host gene expression. *J. Virol.* 77, 4658-4669.
- Kopecky, S.A., Willingham, M.C., and Lyles, D.S. (2001). Matrix protein and another viral component contribute to induction of apoptosis in cells infected with Vesicular Stomatitis Virus. *J. Virol.* 75 12169-12181.
- Kopf, M., Abel, B., Gallimore, A., Carroll, M., and Bachmann, M.F. (2002). Complement component C3 promotes T-cell priming and lung migration to control acute influenza virus infection. *Nat. Med.* 8, 373-378.
- 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.
- Krissinel, E., and Henrick, K. (2004). Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallographica Section D* 60, 2256-2268.
- Krone, B., Kölmel, K.F., Grange, J.M., Mastrangelo, G., Henz, B.M., Botev, I.N., Niin, M., Seebacher, C., Lambert, D., Shafir, R., *et al.* (2003). Impact of vaccinations and infectious diseases on the risk of melanoma—evaluation of an EORTC case-control study. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 39, 2372-2378.
- Kufe, D.W., Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R., Bast, R.C., Gansler, T.S., Holland, J.F., and Frei, E., eds. (2003). *Holland-Frei Cancer Medicine*, 6th edition (Hamilton (ON): BC Decker).
- Kurt-Jones, E.A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L.M., Jones, L.P., Tripp, R.A., Walsh, E.E., Freeman, M.W., Golenbock, D.T., Anderson, L.J., and Finberg, R.W. (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory. *Nat. Immunol.* 1, 398-401.
- Laheru, D., and HJaffee, E.M. (2007). *Cancer Vaccines*. In *The Cancer Handbook*, M.R. Alison, ed. (Chichester: John Wiley & Sons).
- Lanzavecchia, A. (1998). Licence to kill. *Nature* 393, 413-414.

- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., *et al.* (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- Le Blanc, I., Luyet, P.-P., Pons, V., Ferguson, C., Emans, N., Petiot, A., Mayran, N., Demaurex, N., Faure, J., Sadoul, R., *et al.* (2005). Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. *Nat. Cell Biol.* 7, 653-664.
- Le Boeuf, F., Diallo, J.-S., McCart, J.A., Thorne, S., Falls, T., Stanford, M., Kanji, F., Auer, R., Brown, C.W., Lichty, B.D., *et al.* (2010). Synergistic interaction between oncolytic viruses augments tumor killing. *Mol. Ther.* 18, 888-895.
- Lefrancois, L., and Lyles, D.S. (1982). The interaction of antibody with the major surface glycoprotein of vesicular stomatitis virus I. Analysis of neutralizing epitopes with monoclonal antibodies. *Virology* 121, 157-167.
- Legendre, C., Gras, G., Krzysiek, R., Galanaud, P., Richard, Y., and Dormont, D. (1996). Mechanisms of opsonized HIV entry in normal B lymphocytes. *FEBS Lett.* 381, 227-232.
- Lemay, G. (2012). Apprivoiser nos ennemis pour en faire des alliés : la « virothérapie » anticancéreuse. *Med Sci (Paris)* 28, 339-340.
- Lemay, G., Tumilasci, V., and Hiscott, J. (2007). Uncoating Reo: Uncovering the steps critical for oncolysis. *Mol. Ther.* 15, 1406-1407.
- Letchworth, G.J., Rodriguez, L.L., and Del Cbarrera, J. (1999). Vesicular Stomatitis. *The Veterinary Journal* 157, 239-260.
- Leveille, S., Goulet, M.L., Lichty, B.D., and Hiscott, J. (2011). Vesicular stomatitis virus oncolytic treatment interferes with tumor-associated dendritic cell functions and abrogates tumor antigen presentation. *J. Virol.* 85, 12160-12169.
- Levy, D.E., Marié, I., and Prakash, A. (2003). Ringing the interferon alarm: differential regulation of gene expression at the interface between innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 52-58.
- Lewis, C.E., and Pollard, J.W. (2006). Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* 66, 605-612.

- Li, F., Luo, Z., Huang, W., Lu, Q., Wilcox, C.S., Jose, P.A., and Chen, S. (2007). Response gene to complement 32, a novel regulator for transforming growth factor- β -induced smooth muscle differentiation of neural crest cells. *J. Biol. Chem.* 282, 10133-10137.
- Libersou, S., Albertini, A.A.V., Ouldali, M., Maury, V., Maheu, C., Raux, H., de Haas, F., Roche, S., Gaudin, Y., and Lepault, J. (2010). Distinct structural rearrangements of the VSV glycoprotein drive membrane fusion. *The Journal of Cell Biology* 191, 199-210.
- Lichty, B.D., Power, A.T., Stojdl, D.F., and Bell, J.C. (2004). Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. *TRENDS in Molecular Medecine* 10, 211-217.
- Liszewski, K.M., Fang, C.J., and Atkinson, J.P. (2008). Inhibiting complement activation on cells at the step of C3 cleavage. *Vaccine* 26, Supplement 8, I22-I27.
- Liszewski, M., Post, T., and Atkinson, J. (1991). Membrane cofactor protein (MCP or CD46): Newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 431-455.
- Liu, T.-C., Galanis, E., and Kim, D. (2007). Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress. *Nature Clinical Practice Oncology* 4, 101-117.
- Liu, T.-C., and Kim, D. (2005). Viruses with deletions in antiapoptotic genes as potential oncolytic agents. *Oncogene* 24, 6069-6079.
- Loeser, S., Loser, K., Bijker, M.S., Rangachari, M., van der Burg, S.H., Wada, T., Beissert, S., Melief, C.J.M., and Penninger, J.M. (2007). Spontaneous tumor rejection by cbl-b-deficient CD8+ T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 204, 879-891.
- Lorence, R.M., Rood, P.A., and Kelley, K.W. (1988). Newcastle disease virus as an antineoplastic agent: Induction of tumor necrosis factor- α and augmentation of its cytotoxicity. *J. Natl. Cancer Inst.* 80, 1305-1312.
- Lum, D.F., McQuaid, K.R., Gilbertson, V.L., and Hughes-Fulford, M. (1999). Coordinate up-regulation of low-density lipoprotein receptor and cyclo-oxygenase-2 gene expression in human colorectal cells and in colorectal adenocarcinoma biopsies. *Int. J. Cancer* 83, 162-166.
- Luna, E.J. (2012). Cell surface, cytoskeleton, and altered signaling. In *Cancer The outlaw cell*, R.E. LaFond, ed. (New York: Oxford University Press).

- Lyles, D.S. (2000). Cytopathogenesis and inhibition of host gene expression by RNA viruses. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *64*, 709-724.
- Lyles, D.S., McKenzie, M.O., Kaptur, P.E., Grant, K.W., and Jerome, W.G. (1996). Complementation of M gene mutants of Vesicular Stomatitis Virus by plasmid-derived M protein converts spherical extracellular particles into native bullet shapes. *Virology* *217*, 76-87.
- Lyles, D.S., Puddington, L., and McCreedy, B.J.J. (1988). Vesicular stomatitis virus M protein in the nuclei of infected cells. *Journal of virology* *62*, 4387-4392.
- Macor, P., and Tedesco, F. (2007). Complement as effector system in cancer immunotherapy. *Immunol. Lett.* *111*, 6-13.
- Mader, E., Butler, G., Dowdy, S., Mariani, A., Knutson, K., Federspiel, M., Russell, S., Galanis, E., Dietz, A., and Peng, K.-W. (2013). Optimizing patient derived mesenchymal stem cells as virus carriers for a Phase I clinical trial in ovarian cancer. *Journal of Translational Medicine* *11*, 20.
- Magge, D., Guo, Z., O'Malley, M., Francis, L., Ravindranathan, R., and Bartlett, D. (2013). Inhibitors of C5 complement enhance vaccinia virus oncolysis. *Cancer Gene Ther.* *20*, 342-350.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* *454*, 436-444.
- Mantwill, K., Köhler-Vargas, N., Bernshausen, A., Bieler, A., Lage, H., Kaszubiak, A., Surowiak, P., Dravits, T., Treiber, U., Hartung, R., *et al.* (2006). Inhibition of the multidrug-resistant phenotype by targeting YB-1 with a conditionally oncolytic adenovirus: Implications for combinatorial treatment regimen with chemotherapeutic agents. *Cancer Res.* *66*, 7195-7202.
- Marigo, I., Dolcetti, L., Serafini, P., Zanovello, P., and Bronte, V. (2008). Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. *Immunol. Rev.* *222*, 162-179.
- 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., and Martuza, R.L. (2000). Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther.* *7*.

- Markiewski, M.M., DeAngelis, R.A., Benencia, F., Ricklin-Lichtsteiner, S.K., Koutoulaki, A., Gerard, C., Coukos, G., and Lambris, J.D. (2008). Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nat. Immunol.* *9*, 1225-1235.
- Markiewski, M.M., DeAngelis, R.A., Strey, C.W., Foukas, P.G., Gerard, C., Gerard, N., Wetsel, R.A., and Lambris, J.D. (2009). The regulation of liver cell survival by complement. *The Journal of Immunology* *182*, 5412-5418.
- Marsh, J.E., Farmer, C.K., Jurcevic, S., Wang, Y., Carroll, M.C., and Sacks, S. (2001). The allogeneic T and B cell response is strongly dependent on complement components C3 and C4. *Transplantation* *72*, 1310-1318.
- Martuza, R., Malick, A., Markert, J., Ruffner, K., and Coen, D. (1991). Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science* *252*, 854-856.
- Maruyama, T., Rodriguez, L.L., Jahrling, P.B., Sanchez, A., Khan, A.S., Nichol, S.T., Peters, C.J., Parren, P.W.H.I., and Burton, D.R. (1999). Ebola virus can be effectively neutralized by antibody produced in natural human infection. *J. Virol.* *73*, 6024-6030.
- Mastellos, D., and Lambris, J.D. (2002). Complement: more than a guard against invading pathogens? *Trends Immunol.* *23*, 485-491.
- Mastrangelo, G., Rossi, C.R., Pfahlberg, A., Marzia, V., Barba, A., Baldo, M., Fadda, E., Milan, G., and Kölmel, K.F. (2000). Is there a relationship between influenza vaccinations and risk of melanoma? A population-based case-control study. *Eur. J. Epidemiol.* *16*, 777-782.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* *12*, 991-1045.
- McCart, J.A., Ward, J.M., Lee, J., Hu, Y., Alexander, H.R., Libutti, S.K., Moss, B., and Bartlett, D.L. (2001). Systemic cancer therapy with a tumor-selective Vaccinia Virus mutant lacking thymidine kinase and Vaccinia growth factor genes. *Cancer Res.* *61*, 8751-8757.
- McCree, B.J.J., and Lyles, D.S. (1989). Distribution of M protein and nucleocapsid protein of vesicular stomatitis virus in infected cell plasma membranes. *Virus Res.* *14*, 189-205.

- Melki, R., Gaudin, Y., and Blondel, D. (1994). Interaction between tubulin and the viral matrix protein of Vesicular Stomatitis Virus: Possible implications in the viral cytopathic effect. *Virology* 202, 339-347.
- Mhaweche-Fauceglia, P., Wang, D., Samrao, D., Kim, G., Lawrenson, K., Meneses, T., Liu, S., Yessaian, A., and Pejovic, T. (2013). clinical implications of marker expression of carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) in patients with epithelial ovarian carcinoma after treatment with neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Microenvironment*, 1-7.
- Mills, B.J., Beebe, D.P., and Cooper, N.R. (1979). Antibody-independent neutralization of vesicular stomatitis virus by human complement. II. Formation of VSV-lipoprotein complexes in human serum and complement-dependent viral lysis. *J. Immunol.* 123, 2518-2524.
- Mire, C.E., Dube, D., Delos, S.E., White, J.M., and Whitt, M.A. (2009). Glycoprotein-dependent acidification of Vesicular Stomatitis Virus enhances release of matrix protein. *J. Virol.* 83, 12139-12150.
- Morelli, A.E., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Zahorchak, A.F., Logar, A.J., Papworth, G.D., Wang, Z., Watkins, S.C., Falo, L.D., and Thomson, A.W. (2003). Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood* 101, 611-620.
- Moretta, A., Bottino, C., Mingari, M.C., Biassoni, R., and Moretta, L. (2002). What is a natural killer cell? *Nat. Immunol.* 3, 6-8.
- Morón, G., Dadaglio, G., and Leclerc, C. (2004). New tools for antigen delivery to the MHC class I pathway. *Trends Immunol.* 25, 92-97.
- Morris, D., Feng, X., DiFrancesco, L., Fonseca, K., Forsyth, P., Paterson, A., Coffey, M., and Thompson, B. (2013). REO-001: A phase I trial of percutaneous intralesional administration of reovirus type 3 dearing (Reolysin®) in patients with advanced solid tumors. *Invest. New Drugs* 31, 696-706.
- Msaouel, P., Dispenzieri, A., and Galanis, E. (2009). Clinical testing of engineered oncolytic measles virus strains in the treatment of cancer: an overview. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 11, 43-53.

- Muto, S., Větvička, V., and Ross, G. (1993). CR3 (CD11b/CD18) expressed by cytotoxic T cells and natural killer cells is upregulated in a manner similar to neutrophil CR3 following stimulation with various activating agents. *J. Clin. Immunol.* *13*, 175-184.
- Myers, R., Greiner, S., Harvey, M., Soeffker, D., Frenzke, M., Abraham, K., Shaw, A., Rozenblatt, S., Federspiel, M.J., Russell, S.J., and Peng, K.-W. (2005). Oncolytic activities of approved mumps and measles vaccines for therapy of ovarian cancer. *Cancer Gene Ther.* *12*, 593-599.
- Naik, S., and Russell, S.J. (2009). Engineering oncolytic viruses to exploit tumor specific defects in innate immune signaling pathways. *Expert Opin. Biol. Ther.* *9*, 1163-1176.
- Naumov, G.N., Akslen, L.A., and Folkman, J. (2006). Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. *Cell Cycle* *5*, 1779-1787.
- Nemunaitis, J., Khuri, F., Ganly, I., Arseneau, J., Posner, M., Vokes, E., Kuhn, J., McCarty, T., Landers, S., Blackburn, A., *et al.* (2001). Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer. *J. Clin. Oncol.* *19*, 289-298.
- Nguyên, T.L.-A., Abdelbary, H., Arguello, M., Breitbach, C., Leveille, S., Diallo, J.-S., Yasmeen, A., Bismar, T.A., Kirn, D., Falls, T., *et al.* (2008). Chemical targeting of the innate antiviral response by histone deacetylase inhibitors renders refractory cancers sensitive to viral oncolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *105*, 14981-14986.
- Nieswandt, B., Hafner, M., Echtenacher, B., and Männel, D.N. (1999). Lysis of tumor cells by Natural Killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res.* *59*, 1295-1300.
- Ninomiya, H., and Sims, P.J. (1992). The human complement regulatory protein CD59 binds to the alpha-chain of C8 and to the "b" domain of C9. *J. Biol. Chem.* *267*, 13675-13680.
- Norman, K.L., Hirasawa, K., Yang, A.-D., Shields, M.A., and Lee, P.W.K. (2004). Reovirus oncolysis: The Ras/RalGEF/p38 pathway dictates host cell permissiveness to reovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 11099-11104.
- Noser, J.A., Mael, A.A., Sakuma, R., Ohmine, S., Marcato, P., WK Lee, P., and Ikeda, Y. (2007). The RAS/Raf1/MEK/ERK signaling pathway facilitates VSV-mediated oncolysis: Implication for the defective interferon response in cancer cells. *Mol. Ther.* *15*, 1531-1536.

- O'Connell, J.T., Sugimoto, H., Cooke, V.G., MacDonald, B.A., Mehta, A.I., LeBleu, V.S., Dewar, R., Rocha, R.M., Brentani, R.R., Resnick, M.B., *et al.* (2011). VEGF-A and Tenascin-C produced by S100A4+ stromal cells are important for metastatic colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *108*, 16002-16007.
- Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G.M., Apetoh, L., Perfettini, J.-L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., *et al.* (2007). Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* *13*, 54-61.
- Obuchi, M., Fernandez, M., and Barber, G.N. (2003). Development of recombinant vesicular stomatitis viruses that exploit defects in host defense to augment specific oncolytic activity. *J. Virol.* *77*, 8843-8856.
- Ochsenbein, A.F., Pinschewer, D.D., Odermatt, B., Ciurea, A., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (2000). Correlation of T cell independence of antibody responses with antigen dose reaching secondary lymphoid organs: Implications for splenectomized patients and vaccine design. *The Journal of Immunology* *164*, 6296-6302.
- Ochsenbein, A.F., and Zinkernagel, R.M. (2000). Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunol. Today* *21*, 624-630.
- Ojalvo, L.S., King, W., Cox, D., and Pollard, J.W. (2009). High-density gene expression analysis of tumor-associated macrophages from mouse mammary tumors. *The American journal of pathology* *174*, 1048-1064.
- Okazaki, T., and Honjo, T. (2007). PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int. Immunol.* *19*, 813-824.
- Olumi, A.F., Grossfeld, G.D., Hayward, S.W., Carroll, P.R., Tlsty, T.D., and Cunha, G.R. (1999). Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res.* *59*, 5002-5011.
- Oorschot, A.A.A.M.D.-V., Fischer, D.F., Grimbergen, J.M., Klein, B., Zhuang, S.-M., Falkenburg, J.H.F., Backendorf, C., Quax, P.H.A., Van der Eb, A.J., and Noteborn, M.H.M. (1997). Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *94*, 5843-5847.
- Ostrand-Rosenberg, S. (2008a). Cancer and complement. *Nat. Biotechnol.* *26*, 1348-1349.

- Ostrand-Rosenberg, S. (2008b). Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Current Opinion in Genetics & Development* 18, 11-18.
- Outlaw, M.C., and Dimmock, N.J. (1993). IgG neutralization of type A Influenza viruses and the inhibition of the endosomal fusion stage of the infectious pathway in BHK cells. *Virology* 195, 413-421.
- Overwijk, W.W., Tsung, A., Irvine, K.R., Parkhurst, M.R., Goletz, T.J., Tsung, K., Carroll, M.W., Liu, C., Moss, B., Rosenberg, S.A., and Restifo, N.P. (1998). gp100/pmel 17 Is a Murine Tumor Rejection Antigen: Induction of “Self”-reactive, Tumoricidal T Cells Using High-affinity, Altered Peptide Ligand. *The Journal of Experimental Medicine* 188, 277-286.
- Ozduman, K., Wollmann, G., Piepmeier, J.M., and Van den Pol, A.N. (2008). Systemic vesicular stomatitis virus selectively destroys multifocal glioma and metastatic carcinoma in brain. *J. Neurosci.* 28, 1882-1893.
- Pagès, F., Berger, A., Camus, M., Sanchez-Cabo, F., Costes, A., Molidor, R., Mlecnik, B., Kirilovsky, A., Nilsson, M., Damotte, D., *et al.* (2005). Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 353, 2654-2666.
- Palumbo, J.S., Talmage, K.E., Massari, J.V., La Jeunesse, C.M., Flick, M.J., Kombrinck, K.W., Hu, Z., Barney, K.A., and Degen, J.L. (2007). Tumor cell-associated tissue factor and circulating hemostatic factors cooperate to increase metastatic potential through natural killer cell-dependent and-independent mechanisms. *Blood* 110, 133-141.
- Pardoll, D. (2003). Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu. Rev. Immunol.* 21, 807-839.
- Pardoll, D. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* 12, 252-264.
- Parkhurst, M.R., Fitzgerald, E.B., Southwood, S., Sette, A., Rosenberg, S.A., and Kawakami, Y. (1998). Identification of a Shared HLA-A*0201-restricted T-Cell Epitope from the Melanoma Antigen Tyrosinase-related Protein 2 (TRP2). *Cancer Res.* 58, 4895-4901.
- Parry, R.V., Chemnitz, J.M., Frauwirth, K.A., Lanfranco, A.R., Braunstein, I., Kobayashi, S.V., Linsley, P.S., Thompson, C.B., and Riley, J.L. (2005a). CTLA-4 and PD-1

- receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* 25, 9543-9553.
- Parry, R.V., Chemnitz, J.M., Frauwirth, K.A., Lanfranco, A.R., Braunstein, I., Kobayashi, S.V., Linsley, P.S., Thompson, C.B., and Riley, J.L. (2005b). CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* 25, 9543-9553.
- Pasquinucci, G. (1971). Possible effect of measles on leukaemia. *the Lancet* 1, 136.
- Pawelek, J.M., and Chakraborty, A.K. (2008). Fusion of tumour cells with bone marrow-derived cells: a unifying explanation for metastasis. *Nature Reviews Cancer* 8, 377-386.
- Peffault de Latour, R., Amoura, Z., and Socié, G. (2010). L'hémoglobinurie paroxystique nocturne. *La Revue de Médecine Interne* 31, 200-207.
- Penafuerte, C., and Galipeau, J. (2008). TGF β secreted by B16 melanoma antagonizes cancer gene immunotherapy bystander effect. *Cancer Immunol. Immunother.* 57, 1197-1206.
- Peng, K.-W., TenEyck, C.J., Galanis, E., Kalli, K.R., Hartmann, L.C., and Russell, S.J. (2002). Intraperitoneal therapy of ovarian cancer using an engineered Measles virus. *Cancer Res.* 62, 4656-4662.
- Pensiero, M.N., Wysocki, C.A., Nader, K., and Kikuchi, G.E. (1996). Development of amphotropic murine retrovirus vectors resistant to inactivation by human serum. *Hum. Gene Ther.* 7, 1095-1101.
- Petersen, J.M., Her, L.-S., and Dahlberg, J.E. (2001). Multiple vesiculoviral matrix proteins inhibit both nuclear export and import. *PNAS* 98, 8590-8595.
- Petersen, J.M., Her, L.S., Varvel, V., Lund, E., and Dahlberg, J.E. (2000). The matrix protein of vesicular stomatitis virus inhibits nucleocytoplasmic transport when it is in the nucleus and associated with nuclear pore complexes. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8590-8601.
- Phan, V., Errington, F., Cheong, S.C., Kottke, T., Gough, M., Altmann, S., Brandenburger, A., Emery, S., Strome, S., Bateman, A., *et al.* (2003). A new genetic method to generate and isolate small, short-lived but highly potent dendritic cell-tumor cell hybrid vaccines. *Nat. Med.* 9, 1215-1219.
- Piccioli, D., Sbrana, S., Melandri, E., and Valiante, N.M. (2002). Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by Natural Killer cells. *The Journal of Experimental Medicine* 195, 335-341.

- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.P., Näslund, T.I., Liljeström, P., Weber, F., and Reis e Sousa, C. (2006). RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-Phosphates. *Science* *314*, 997-1001.
- Pitot, H.C., ed. (1986). *Fundamentals of Oncology*, 3rd edn (New York: Marcel Dekker Inc.).
- Pitot, H.C. (2012). *Cancer - An Overview*. In *Cancer The outlaw cell*, R.E. LaFond, ed. (New York: Oxford University Press).
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* *284*, 143-147.
- Pollard, J.W. (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer* *4*, 71-78.
- Porichis, F., and Kaufmann, D. (2012). Role of PD-1 in HIV pathogenesis and as target for therapy. *Curr. HIV/AIDS Rep.* *9*, 81-90.
- Pouyssegur, J., Dayan, F., and Mazure, N.M. (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* *441*, 437-443.
- Power, A.T., Wang, J., Falls, T.J., Paterson, J.M., Parato, K.A., Lichty, B.D., Stojdl, D.F., Forsyth, P.A., Atkins, H., and Bell, J.C. (2007). Carrier cell-based delivery of an oncolytic virus circumvents antiviral immunity. *Mol. Ther.* *15*, 123-130.
- Prestwich, R.J., Ilett, E.J., Errington, F., Diaz, R.M., Steele, L.P., Kottke, T., Thompson, J., Galivo, F., Harrington, K.J., Pandha, H.S., *et al.* (2009). Immune-mediated antitumor activity of Reovirus is required for therapy and is independent of direct viral oncolysis and replication. *Clin. Cancer Res.* *15*, 4374-4381.
- Prevost-Blondel, A., Zimmermann, C., Stemmer, C., Kulmburg, P., Rosenthal, F.M., and Pircher, H. (1998). Tumor-infiltrating lymphocytes exhibiting high ex vivo cytolytic activity fail to prevent murine melanoma tumor growth in vivo. *J. Immunol.* *161*, 2187-2194.
- Princiotta, M.F., Finzi, D., Qian, S.-B., Gibbs, J., Schuchmann, S., Buttgereit, F., Bennink, J.R., and Yewdell, J.W. (2003). Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* *18*, 343-354.
- Pucci, F., Venneri, M.A., Biziato, D., Nonis, A., Moi, D., Sica, A., Di Serio, C., Naldini, L., and De Palma, M. (2009). A distinguishing gene signature shared by tumor-infiltrating

- Tie2-expressing monocytes, blood “resident” monocytes, and embryonic macrophages suggests common functions and developmental relationships. *Blood* 114, 901-914.
- Puhmann, 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.
- Qiao, J., Kottke, T., Willmon, C., Galivo, F., Wongthida, P., Diaz, R.M., Thompson, J., Ryno, P., Barber, G.N., Chester, J., *et al.* (2008a). Purging metastases in lymphoid organs using a combination of antigen-nonspecific adoptive T cell therapy, oncolytic virotherapy and immunotherapy. *Nat. Med.* 14, 37-44.
- Qiao, J., Wang, H., Kottke, T., Diaz, R.M., Willmon, C., Hudacek, A., Thompson, J., Parato, K., Bell, J., Naik, J., *et al.* (2008b). Loading of oncolytic vesicular stomatitis virus onto antigen-specific T cells enhances the efficacy of adoptive T-cell therapy of tumors. *Gene Ther.* 15, 604-616.
- Radoja, S., Rao, T.D., Hillman, D., and Frey, A.B. (2000). Mice bearing late-stage tumors have normal functional systemic T cell responses in vitro and in vivo. *The Journal of Immunology* 164, 2619-2628.
- Raz, Y., and Erez, N. (2013). An inflammatory vicious cycle: Fibroblasts and immune cell recruitment in cancer. *Exp. Cell Res.* 319, 1596-1603.
- Reeves, R.H., O'Hara, B.F., Pavan, W.J., Gearhart, J.D., and Haller, O. (1988). Genetic mapping of the Mx influenza virus resistance gene within the region of mouse chromosome 16 that is homologous to human chromosome 21. *J. Virol.* 62, 4372-4375.
- Reichard, K.W., Lorence, R.M., Cascino, C.J., Peeples, M.E., Walter, R.J., Fernando, M.B., Reyes, H.M., and Greager, J.A. (1992). Newcastle disease virus selectively kills human tumor cells. *J. Surg. Res.* 52, 448-453.
- Reid, T., Galanis, E., Abbruzzese, J., Sze, D., Wein, L.M., Andrews, J., Randlev, B., Heise, C., Uprichard, M., Hatfield, M., *et al.* (2002). Hepatic Arterial Infusion of a Replication-selective Oncolytic Adenovirus (dl1520): Phase II Viral, Immunologic, and Clinical Endpoints. *Cancer Res.* 62, 6070-6079.
- Reits, E.A.J., Vos, J.C., Gromme, M., and Neefjes, J. (2000). The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature* 404, 774-778.

- Renukaradhya, G.J., Khan, M.A., Shaji, D., and Brutkiewicz, R.R. (2008). Vesicular stomatitis virus matrix protein impairs CD1d-mediated antigen presentation through activation of the p38 MAPK pathway. *J. Virol.* *82*, 12535-12542.
- Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., and Lambris, J.D. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* *11*, 785-797.
- Ricklin, D., and Lambris, J.D. (2007). Complement-targeted therapeutics. *Nat. Biotechnol.* *25*, 1265-1275.
- Ries, S., and Korn, W.M. (2002). ONYX-015: mechanisms of action and clinical potential of a replication-selective adenovirus. *Br. J. Cancer* *86*, 5-11.
- Rigg, R.J., Chen, J., Dando, J.S., Forestell, S.P., Plavec, I., and BÖHnlein, E. (1996). A novel human amphotropic packaging cell line: High titer, complement resistance, and improved safety. *Virology* *218*, 290-295.
- Roben, P., Moore, J.P., Thali, M., Sodroski, J., Barbas, C.F., and Burton, D.R. (1994). Recognition properties of a panel of human recombinant Fab fragments to the CD4 binding site of gp120 that show differing abilities to neutralize human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* *68*, 4821-4828.
- Roche, S., Bressanelli, S., Rey, F.A., and Gaudin, Y. (2006). Crystal structure of the low-pH form of the Vesicular Stomatitis Virus glycoprotein G. *Science* *313*, 187-191.
- Roche, S., Rey, F.A., Gaudin, Y., and Bressanelli, S. (2007). Structure of the prefusion form of the Vesicular Stomatitis Virus glycoprotein G. *Science* *315*, 843-848.
- Roda, J.M., Parihar, R., Lehman, A., Mani, A., Tridandapani, S., and Carson, W.E. (2006). Interleukin-21 enhances NK cell activation in response to antibody-coated targets. *The Journal of Immunology* *177*, 120-129.
- Rogulski, K.R., Freytag, S.O., Zhang, K., Gilbert, J.D., Paielli, D.L., Kim, J.H., Heise, C.C., and Kirn, D.H. (2000). In vivo antitumor activity of ONYX-015 is influenced by p53 status and is augmented by radiotherapy. *Cancer Res.* *60*, 1193-1196.
- Rohde, J., Emschermann, F., Knittler, M., and Rziha, H.-J. (2012). Orf virus interferes with MHC class I surface expression by targeting vesicular transport and Golgi. *BMC Vet. Res.* *8*, 114.
- Rollins, S.A., Birks, C.W., Setter, E., Squinto, S.P., and Rother, R.P. (1996). Retroviral vector producer cell killing in human serum is mediated by natural antibody and

- complement: Strategies for evading the humoral immune response. *Hum. Gene Ther.* 7, 619-626.
- Rommelfanger, D.M., Offord, C.P., Dev, J., Bajzer, Z., Vile, R.G., and Dingli, D. (2012). Dynamics of melanoma tumor therapy with vesicular stomatitis virus: explaining the variability in outcomes using mathematical modeling. *Gene Ther.* 19, 543-549.
- Roost, H.P., Bachmann, M.F., Haag, A., Kalinke, U., Pliska, V., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (1995). Early high-affinity neutralizing anti-viral IgG responses without further overall improvements of affinity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 1257-1261.
- Rose, J.K., and Whitt, M.A. (2001). Rhabdoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe D.M., Howley P.M. (eds). *Fields Virology*, 4th edn (Philadelphia).
- Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parrott, R.H., and Ward, T.G. (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 84, 570-573.
- Russell, S.J., Peng, K.-W., and Bell, J.C. (2012). Oncolytic virotherapy. *Nat. Biotechnol.* 30, 658-670.
- Rutkowski, M., Sughrue, M., Kane, A., Ahn, B., Fang, S., and Parsa, A. (2010a). The complement cascade as a mediator of tissue growth and regeneration. *Inflamm. Res.* 59, 897-905.
- Rutkowski, M.J., Sughrue, M.E., Kane, A.J., Mills, S.A., Fang, S., and Parsa, A.T. (2010b). Complement and the central nervous system: emerging roles in development, protection and regeneration. *Immunol. Cell Biol.* 88, 781-786.
- Rutkowski, M.J., Sughrue, M.E., Kane, A.J., Mills, S.A., and Parsa, A.T. (2010c). Cancer and the complement cascade. *Mol. Cancer Res.* 8, 1453-1465.
- Saifuddin, M., Hedayati, T., Atkinson, J.P., Holguin, M.H., Parker, C.J., and Spear, G.T. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 incorporates both glycosyl phosphatidylinositol-anchored CD55 and CD59 and integral membrane CD46 at levels that protect from complement-mediated destruction. *J. Gen. Virol.* 78, 1907-1911.

- Saigusa, K., Imoto, I., Tanikawa, C., Aoyagi, M., Ohno, K., Nakamura, Y., and Inazawa, J. (2006). RGC32, a novel p53-inducible gene, is located on centrosomes during mitosis and results in G2/M arrest. *Oncogene* 26, 1110-1121.
- Samuel, C.E., and Brody, M.S. (1990). Biosynthesis of reovirus-specified polypeptides. 2-aminopurine increases the efficiency of translation of reovirus s1 mRNA but not s4 mRNA in transfected cells. *Virology* 176, 106-113.
- Sato, E., Olson, S.H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H., Qian, F., Jungbluth, A.A., Frosina, D., Gnjjatic, S., Ambrosone, C., *et al.* (2005). Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 18538-18543.
- Schattner, A. (1984). Therapeutic role of measles vaccine in Hodgkin's disease. *The Lancet* 1.
- Schellerer, V.S., Langheinrich, M., Hohenberger, W., Croner, R.S., Merkel, S., Rau, T.T., Stürzl, M., and Naschberger, E. (2013). Tumor-associated fibroblasts isolated from colorectal cancer tissues exhibit increased ICAM-1 expression and affinity for monocytes. *Oncol. Rep.* 31, 255-261.
- Schiff, L.A., Nibert, M.L., Co, M.S., Brown, E.G., and Fields, B.N. (1988). Distinct binding sites for zinc and double-stranded RNA in the reovirus outer capsid protein sigma 3. *Mol. Cell. Biol.* 8, 273-283.
- Schincariol, A.L., and Howatson, A.F. (1970). Replication of vesicular stomatitis virus : I. Viral specific RNA and nucleoprotein in infected L cells. *Virology* 42, 732-743.
- Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331, 1565-1570.
- Schubert, U., Anton, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W., and Bennink, J.R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404, 770-774.
- Schuler, L., Daura, X., and van Gunsteren, W. (2001). An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase. *Journal of Computational Chemistry* 22, 1205-1218.
- Schwartz, J.A., Buonocore, L., Suguitan, A.L., Jr., Silaghi, A., Kobasa, D., Kobinger, G., Feldmann, H., Subbarao, K., and Rose, J.K. (2010). Potent Vesicular Stomatitis Virus-

- based avian Influenza vaccines provide long-term sterilizing immunity against heterologous challenge. *J. Virol.* *84*, 4611-4618.
- Seiler, P., Bründler, M.-A., Zimmermann, C., Weibel, D., Bruns, M., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (1998). Induction of protective cytotoxic T cell responses in the presence of high titers of virus-neutralizing antibodies: Implications for passive and active immunization. *The Journal of Experimental Medicine* *187*, 649-654.
- Selby, M.J., Engelhardt, J.J., Quigley, M., Henning, K.A., Chen, T., Srinivasan, M., and Korman, A.J. (2013). Anti-CTLA-4 antibodies of IgG2a isotype enhance antitumor activity through reduction of intratumoral regulatory T cells. *Cancer Immunology Research*.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN[gamma] and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature (London)* *410*, 1107-1111.
- Sharma, S., tenOever, B.R., Grandvaux, N., Zhou, G.-P., Lin, R., and Hiscott, J. (2003). Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* *300*, 1148-1151.
- Shaw, M.L., Stone, K.L., Colangelo, C.M., Gulcicek, E.E., and Palese, P. (2008). Cellular proteins in influenza virus particles. *PLoS Pathog.* *4*, e1000085.
- Sherr, C. (1996). Cancer cell cycle. *Science* *274*, 1672-1677.
- Shope, R., and Tesh, R. (1987). The ecology of rhabdoviruses that infect vertebrates. In Wagner R, ed. *The rhabdoviruses*, 509-534.
- Sica, A., and Bronte, V. (2007). Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *The Journal of Clinical Investigation* *117*, 1155-1166.
- Sier, C.F.M., Gelderman, K.A., Prins, F.A., and Gorter, A. (2004). Beta-glucan enhanced killing of renal cell carcinoma micrometastases by monoclonal antibody G250 directed complement activation. *Int. J. Cancer* *109*, 900-908.
- Sigal, L.J., Crotty, S., Andino, R., and Rock, K.L. (1999). Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* *398*, 77-80.
- Sims, G.P., Rowe, D.C., Rietdijk, S.T., Herbst, R., and Coyle, A.J. (2010). HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu. Rev. Immunol.* *28*, 367-388.

- Sinkovics, J., and Horvath, J. (2008). Natural and genetically engineered viral agents for oncolysis and gene therapy of human cancers. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 56, 1-59.
- Smith, K.D., Mezhir, J.J., Bickenbach, K., Veerapong, J., Charron, J., Posner, M.C., Roizman, B., and Weichselbaum, R.R. (2006). Activated MEK suppresses activation of PKR and enables efficient replication and in vivo oncolysis by $\Delta\gamma 134.5$ mutants of Herpes Simplex Virus 1. *J. Virol.* 80, 1110-1120.
- Smyth, M.J., Thia, K.Y.T., Street, S.E.A., Cretney, E., Trapani, J.A., Taniguchi, M., Kawano, T., Pelikan, S.B., Crowe, N.Y., and Godfrey, D.I. (2000). Differential tumor surveillance by Natural Killer (Nk) and Nkt Cells. *The Journal of Experimental Medicine* 191, 661-668.
- Société canadienne du cancer, and Agence de la santé publique du Canada et Santé Canada (2012). *Statistiques canadiennes sur le cancer 2012.* (Toronto (Ontario), Société canadienne du cancer), p. 73.
- Soelder, B.M., Reisinger, E.C., Koefler, D., Bitterlich, G., Wachter, H., and Dierich, M.P. (1989). Complement receptors: Another port of entry for HIV. *The Lancet* 334, 271-272.
- Spaeth, E., Klopp, A., Dembinski, J., Andreeff, M., and Marini, F. (2008). Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther.* 15, 730-738.
- Speiser, D.E. (2012). A molecular profile of T-cell exhaustion in cancer. *OncoImmunology* 1, 369-371.
- Stacheli, P., Haller, O., Boll, W., Lindenmann, J., and Weissmann, C. (1986). Mx protein: Constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus. *Cell* 44, 147-158.
- Stanners, C.P., and Goldberg, V.J. (1975). On the mechanism of neurotropism of Vesicular Stomatitis Virus in newborn hamsters. Studies with temperature-sensitive mutants. *J. Gen. Virol.* 29, 281-296.
- Stark, G.R., Kerr, I.M., and Williams, B.R. (1998). How cells respond to interferons. p. 227.
- Steinhauer, D.A., de la Torre, J.C., and Holland, J.J. (1989). High nucleotide substitution error frequencies in clonal pools of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 63, 2063-2071.

- Stoermer, K.A., and Morrison, T.E. (2011). Complement and viral pathogenesis. *Virology* 411, 362-373.
- Stoiber, H., Clivio, A., and Dierich, M.P. (1997). Role of complement in HIV infection. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 649-674.
- Stojdl, D.F., Lichty, B., Knowles, S., Marius, R., Atkins, H., Sonenberg, N., and Bell, J.C. (2000a). Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat. Med.* 6, 821-825.
- Stojdl, D.F., Lichty, B., Knowles, S., Marius, R., Atkins, H., Sonenberg, N., and Bell, J.C. (2000b). Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat. Med.* 6, 821-825.
- Stojdl, D.F., Lichty, B.D., tenOever, B.R., Paterson, J.M., Power, A.T., Knowles, S., Marius, R., Reynard, J., Poliquin, L., Atkins, H., *et al.* (2003). VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* 4, 263-275
- Stutman, O. (1974). Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* 183, 534-536.
- Stutman, O. (1976). Immunodepression and malignancy. In *Adv. Cancer Res.*, S.W. George Klein, and H. Alexander, eds. (Academic Press), pp. 261-422.
- Sun, X., Yau, V.K., Briggs, B.J., and Whittaker, G.R. (2005). Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology* 338, 53-60.
- Swintek, B.D., and Lyles, D.S. (2008). Plasma Membrane Microdomains Containing Vesicular Stomatitis Virus M Protein Are Separate from Microdomains Containing G Protein and Nucleocapsids. *J. Virol.* 82, 5536-5547.
- Szomolanyi-Tsuda, E., and Welsh, R.M. (1998). T-cell-independent antiviral antibody responses. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 431-435.
- Takeuchi, Y., Cosset, F.L., Lachmann, P.J., Okada, H., Weiss, R.A., and Collins, M.K. (1994). Type C retrovirus inactivation by human complement is determined by both the viral genome and the producer cell. *J. Virol.* 68, 8001-8007.
- Takeuchi, Y., Liang, S.H., Bieniasz, P.D., Jäger, U., Porter, C.D., Friedman, T., McClure, M.O., and Weiss, R.A. (1997). Sensitization of rhabdo-, lenti-, and spumaviruses to human serum by galactosyl(α1-3)galactosylation. *J. Virol.* 71, 6174-6178.

- Takeuchi, Y., Porter, C.D., Strahan, K.M., Preece, A.F., Gustafsson, K., Cosset, F.-L., Weiss, R.A., and Collins, M.K.L. (1996). Sensitization of cells and retroviruses to human serum by ([alpha]l-3) galactosyltransferase. *Nature* 379, 85-88.
- Taqi, M. (1981). Regression of Hodgkin's disease after measles. *The Lancet* 1.
- tenOever, B.R., Sharma, S., Zou, W., Sun, Q., Grandvaux, N., Julkunen, I., Hemmi, H., Yamamoto, M., Akira, S., Yeh, W.-C., *et al.* (2004). Activation of TBK1 and IKKε kinases by Vesicular Stomatitis Virus infection and the role of viral ribonucleoprotein in the development of interferon antiviral immunity. *J. Virol.* 78, 10636-10649.
- Thiel, S. (2007). Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins. *Mol. Immunol.* 44, 3875-3888.
- Thomas, L. (1959). Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states. H.S. Lawrence, ed. (New York: Hoeber-Harper).
- Thomsen, A.R., Nansen, A., Andersen, C., Johansen, J., Marker, O., and Christensen, J.P. (1997). Cooperation of B cells and T cells is required for survival of mice infected with vesicular stomatitis virus. *Int. Immunol.* 9, 1757-1766.
- Tlsty, T.D., and Coussens, L.M. (2006). Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 1, 119-150.
- Toda, M., Rabkin, S.D., Kojima, H., and Martuza, R.L. (1999). Herpes simplex virus as an in situ cancer vaccine for the induction of specific anti-tumor immunity. *Hum. Gene Ther.* 10, 385-393.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 6396-6401.
- Toucheffeu, Y., Schick, U., and Harrington, K.J. (2012). Le virus de la rougeole. *Med Sci (Paris)* 28, 388-394.
- Uematsu, S., and Akira, S. (2007). Toll-like receptors and type I interferons. *J. Biol. Chem.* 282, 15319-15323.
- Vähä-Koskela, M.J.V., Heikkilä, J.E., and Hinkkanen, A.E. (2007). Oncolytic viruses in cancer therapy. *Cancer Lett.* 254, 178-216.

- van Beusechem, V.W., van den Doel, P.B., Grill, J., Pinedo, H.M., and Gerritsen, W.R. (2002). Conditionally replicative adenovirus expressing p53 exhibits enhanced oncolytic potency. *Cancer Res.* 62, 6165-6171.
- van Houdt, I.S., Sluijter, B.J.R., Moesbergen, L.M., Vos, W.M., de Gruijl, T.D., Molenkamp, B.G., van den Eertwegh, A.J.M., Hooijberg, E., van Leeuwen, P.A.M., Meijer, C.J.L.M., and Oudejans, J.J. (2008). Favorable outcome in clinically stage II melanoma patients is associated with the presence of activated tumor infiltrating T-lymphocytes and preserved MHC class I antigen expression. *Int. J. Cancer* 123, 609-615.
- van Pesch, V., Lanaya, H., Renauld, J.-C., and Michiels, T. (2004). Characterization of the murine alpha interferon gene family. *J. Virol.* 78, 8219-8228.
- van Rikxoort, M., Michaelis, M., Wolschek, M., Muster, T., Egorov, A., Seipelt, J., Doerr, H.W., and Cinatl, J., Jr. (2012). Oncolytic effects of a novel Influenza A virus expressing interleukin-15 from the NS reading frame. *PLoS ONE* 7, e36506.
- Vandepol, S.B., Lefrancois, L., and Holland, J.J. (1986a). Sequences of the major antibody binding epitopes of the Indiana serotype of vesicular stomatitis virus. *Virology* 148, 312-325.
- Vandepol, S.B., Lefrançois, L., and Holland, J.J. (1986b). Sequences of the major antibody binding epitopes of the Indiana serotype of Vesicular Stimatitis Virus. *Virol. J.* 148, 312-325.
- Vanderplasschen, A., Mathew, E., Hollinshead, M., Sim, R.B., and Smith, G.L. (1998). Extracellular enveloped vaccinia virus is resistant to complement because of incorporation of host complement control proteins into its envelope. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 7544-7549.
- Veerapong, J., Bickenbach, K.A., Shao, M.Y., Smith, K.D., Posner, M.C., Roizman, B., and Weichselbaum, R.R. (2007). Systemic delivery of γ 134.5-deleted Herpes Simplex Virus-1 selectively targets and treats distant human xenograft tumors that express high MEK activity. *Cancer Res.* 67, 8301-8306.
- Venkatesha, R.T., Thangam, E.B., Zaidi, A.K., and Ali, H. (2005). Distinct regulation of C3a-induced MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5 production in human mast cells by extracellular signal regulated kinase and PI3 kinase. *Mol. Immunol.* 42, 581-587.

- Verbovetski, I., Bychkov, H., Trahtenberg, U., Shapira, I., Hareuveni, M., Ben-Tal, O., Kutikov, I., Gill, O., and Mevorach, D. (2002). Opsonization of apoptotic cells by autologous iC3b facilitates clearance by immature dendritic cells, down-regulates DR and CD86, and up-regulates CC chemokine receptor 7. *The Journal of Experimental Medicine* *196*, 1553-1561.
- Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu. Rev. Immunol.* *29*, 235-271.
- Vieira, P., and Rajewsky, K. (1988). The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice. *Eur. J. Immunol.* *18*, 313-316.
- Vitale, M., Chiesa, M.D., Carlomagno, S., Pende, D., Aricò, M., Moretta, L., and Moretta, A. (2005). NK-dependent DC maturation is mediated by TNF α and IFN γ released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood* *106*, 566-571.
- Vivanco, I., and Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer* *2*, 489-501.
- Vogel, C.W., Smith, C.A., and Müller-Eberhard, H.J. (1984). Cobra venom factor: structural homology with the third component of human complement. *The Journal of Immunology* *133*, 3235-3241.
- Vong, S., and Kalluri, R. (2011). The role of stromal myofibroblast and extracellular matrix in tumor angiogenesis. *Genes & Cancer* *2*, 1139-1145.
- Wagner, E.K., and Hewlett, M.J. (2004). *Basic Virology*, 2 edn (État-Unis).
- Wagner, R.R. (1954). Influenza virus infection of transplanted tumors: I. Multiplication of a “neurotropic” strain and its effect on solid neoplasms. *Cancer Res.* *14*, 377-385.
- Walport, M.J. (2001a). Complement. *N. Engl. J. Med.* *344*, 1140-1144.
- Walport, M.J. (2001b). Complement. *N. Engl. J. Med.* *344*, 1058-1066.
- Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S.H., Zitvogel, L., and Vivier, E. (2005). Natural-killer cells and dendritic cells: “l'union fait la force”. *Blood* *106*, 2252-2258.
- Wang, S.-Y., Racila, E., Taylor, R.P., and Weiner, G.J. (2008). NK-cell activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity induced by rituximab-coated target cells is inhibited by the C3b component of complement. *Blood* *111*, 1456-1463.
- Wang, S.-Y., Veeramani, S., Racila, E., Cagley, J., Fritzinger, D.C., Vogel, C.-W., St John, W., and Weiner, G.J. (2009). Depletion of the C3 component of complement enhances

- the ability of rituximab-coated target cells to activate human NK cells and improves the efficacy of monoclonal antibody therapy in an in vivo model. *Blood* *114*, 5322-5330.
- Ward, T., Pipkin, P.A., Clarkson, N.A., Stone, D., Minor, P.D., and Almond, J.W. (1994). Decay-accelerating factor CD55 is identified as the receptor for echovirus 7 using CELICS, a rapid immuno-focal cloning method. *EMBO J.* *13*, 5070-5074.
- Weber, F., Wagner, V., Rasmussen, S.B., Hartmann, R., and Paludan, S.R. (2006). Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *J. Virol.* *80*, 5059-5064.
- Wherry, E.J. (2011). T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* *12*, 492-499.
- Whitt, M.A. (2010). Generation of VSV pseudotypes using recombinant [Delta]G-VSV for studies on virus entry, identification of entry inhibitors, and immune responses to vaccines. *J. Virol. Methods* *169*, 365-374.
- Williams, B.R. (1999). PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* *18*, 6112-6120.
- Willnow, T.E. (1999). The low-density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipid metabolism. *J. Mol. Med.* *77*, 306-315.
- Wolchok, J.D., Kluger, H., Callahan, M.K., Postow, M.A., Rizvi, N.A., Lesokhin, A.M., Segal, N.H., Ariyan, C.E., Gordon, R.-A., Reed, K., *et al.* (2013). Nivolumab plus Ipilimumab in advanced melanoma. *N. Engl. J. Med.*
- Wollmann, G., Rogulin, V., Simon, I., Rose, J.K., and van den Pol, A.N. (2010). Some Attenuated Variants of Vesicular Stomatitis Virus Show Enhanced Oncolytic Activity against Human Glioblastoma Cells relative to Normal Brain Cells. *J. Virol.* *84*, 1563-1573.
- Wongthida, P., Diaz, R.M., Galivo, F., Kottke, T., Thompson, J., Melcher, A., and Vile, R. (2010a). VSV oncolytic virotherapy in the B16 model depends upon intact MyD88 signaling. *Mol. Ther.*
- Wongthida, P., Diaz, R.M., Galivo, F., Kottke, T., Thompson, J., Pulido, J., Pavelko, K., Pease, L., Melcher, A., and Vile, R. (2010b). Type III IFN interleukin-28 mediates the antitumor efficacy of oncolytic virus VSV in immune-competent mouse models of cancer. *Cancer Res.* *70*, 4539-4549.
- Wongthida, P., Diaz, R.M., Pulido, C., Rommelfanger, D., Galivo, F., Kaluza, K., Kottke, T., Thompson, J., Melcher, A., and Vile, R. (2011). Activating systemic T-cell immunity

- against self tumor antigens to support oncolytic virotherapy with vesicular stomatitis virus. *Hum. Gene Ther.* 22, 1343-1353.
- Wu, Y., Lun, X., Zhou, H., Wang, L., Sun, B., Bell, J.C., Barrett, J.W., McFadden, G., Biegel, J.A., Senger, D.L., and Forsyth, P.A. (2008). Oncolytic efficacy of recombinant vesicular stomatitis virus and myxoma virus in experimental models of rhabdoid tumors. *Clin. Cancer Res.* 14, 1218-1227.
- Wyckoff, J., Wang, W., Lin, E.Y., Wang, Y., Pixley, F., Stanley, E.R., Graf, T., Pollard, J.W., Segall, J., and Condeelis, J. (2004). A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res.* 64, 7022-7029.
- Yamazaki, T., Akiba, H., Iwai, H., Matsuda, H., Aoki, M., Tanno, Y., Shin, T., Tsuchiya, H., Pardoll, D.M., Okumura, K., *et al.* (2002). Expression of Programmed Death 1 Ligands by Murine T Cells and APC. *The Journal of Immunology* 169, 5538-5545.
- Yang, L., Huang, J., Ren, X., Gorska, A.E., Chytil, A., Aakre, M., Carbone, D.P., Matrisian, Lynn M., Richmond, A., Lin, P.C., and Moses, H.L. (2008). Abrogation of TGF β signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis. *Cancer Cell* 13, 23-35.
- Ye, Z., Sun, K., Suryanarayana, K., Justice, P., Robinson, D.G., and Wagner, R.R. (1994). Membrane-binding domains and cytopathogenesis of the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *Journal of virology* 68, 7386-7396.
- Yoboua, F., Martel, A., Duval, A., Mukawera, E., and Grandvaux, N. (2010). Respiratory Syncytial Virus-Mediated NF- κ B p65 Phosphorylation at Serine 536 Is Dependent on RIG-I, TRAF6, and IKK β . *J. Virol.* 84, 7267-7277.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., and Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* 5, 730-737.
- Zhang, X., Green, T.J., Tsao, J., Qiu, S., and Luo, M. (2008). Role of intermolecular interactions of Vesicular Stomatitis Virus nucleoprotein in RNA encapsidation. *J. Virol.* 82, 674-682.

- Zhao, J.-m., Wen, Y.-j., Li, Q., Wang, Y.-s., Wu, H.-b., Xu, J.-r., Chen, X.-c., Wu, Y., Fan, L.-y., Yang, H.-s., *et al.* (2008). A promising cancer gene therapy agent based on the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *FASEB J.* 22, 4272-4280.
- Zhou, A., Paranjape, J., Brown, T.L., Nie, H., Naik, S., Dong, B., Chang, A., Trapp, B., Fairchild, R., Colmenares, C., and Silverman, R.H. (1997). Interferon action and apoptosis are defective in mice devoid of 2',5'-oligoadenylate-dependent RNase L. *EMBO J.* 16, 6355-6363.
- Zhou, A., Paranjape, J.M., Der, S.D., Williams, B.R.G., and Silverman, R.H. (1999). Interferon action in triply deficient mice reveals the existence of alternative antiviral pathways. *Virology* 258, 435-440.
- Zúñiga, M.C., Wang, H., Barry, M., and McFadden, G. (1999). Endosomal/Lysosomal Retention and Degradation of Major Histocompatibility Complex Class I Molecules Is Induced by Myxoma Virus. *Virology* 261, 180-192.