

THESE DE DOCTORAT

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie-Santé

Spécialité : Immunologie et Cancérologie

Par

Camille CHATELAIN

Rôles des cellules myéloïdes du microenvironnement tumoral lors d'une infection par le virus oncolytique de la rougeole

L'interféron de type I dans l'immunothérapie du mésothéliome pleural malin

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le cinq décembre 2023

Unité de recherche : Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Intégrée Nantes-Angers (CRCI2NA), INSERM UMR1307, CNRS UMR6075, Nantes Université, Université d'Angers

Rapporteurs avant soutenance :

Branka HORVAT
Lucas WILLEMS

Directrice de recherche, HDR, Université de Lyon
Directeur de recherche, HDR, Université de Liège

Composition du Jury :

Présidente : Nadine GERVOIS
Dir. de thèse : Jean-François FONTENEAU

Professeure des universités, Université de Nantes
Chargé de recherche, HDR, Université de Nantes

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABREVIATIONS	V
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	X
REMERCIEMENTS.....	XI
INTRODUCTION	XIII
LE MICROENVIRONNEMENT TUMORAL.....	17
<i>Composition et hétérogénéité du microenvironnement tumoral.....</i>	<i>17</i>
Les cellules stromales et la matrice.....	18
Les cellules de l'infiltrat immunitaire	18
Les cellules de l'immunité innée.....	19
Les monocytes.....	20
Les macrophages.....	21
Fonctions des macrophages	21
Recrutement et classification des macrophages associés aux tumeurs	21
Fonctions des macrophages associés aux tumeurs.....	22
Les cellules dendritiques.....	24
Classification des cellules dendritiques	24
Fonctions des cellules dendritiques	25
Inhibition des cellules dendritiques dans le microenvironnement.....	26
Les cellules de l'immunité adaptative	26
<i>Support de la progression tumorale.....</i>	<i>28</i>
L'inflammation du TME.....	28
L'immunosuppression du système immunitaire	29
<i>Stratégies thérapeutiques visant le TME.....</i>	<i>30</i>
LE MESOTHELIOME PLEURAL MALIN.....	32
<i>Description, épidémiologie et classification</i>	<i>32</i>
<i>Particularités du mésothéliome pleural malin.....</i>	<i>33</i>
Particularités génétiques des cellules tumorales	33
Composition de l'infiltrat immunitaire.....	35
<i>Traitements</i>	<i>36</i>
L'IMMUNOTHERAPIE ONCOLYTIQUE	38
<i>Les virus et le cancer.....</i>	<i>38</i>
<i>Réplication spécifique des virus oncolytiques dans les cellules tumorales.....</i>	<i>39</i>
La réponse interféron de type I.....	41
La réponse interféron de type I dans le cancer	43
<i>La mort immunogène induite par les OV.....</i>	<i>45</i>
Induction de la réponse immunitaire innée.....	45
Initiation de la réponse immunitaire adaptative	47

Table des matières

Modulation du microenvironnement tumoral par les virus oncolytiques	47
<i>Les virus oncolytiques en clinique</i>	48
LE VIRUS DE LA ROUGEOLE	51
<i>La rougeole</i>	51
<i>Structure et génome viral</i>	51
<i>Tropisme</i>	52
<i>Cycle réplcatif du MV</i>	53
<i>La souche vaccinale du MV</i>	54
<i>Mécanismes de sensibilité des cellules tumorales au MV</i>	55
Surexpression des récepteurs d'entrée du MV	55
Altérations de la réponse antivirale	56
Sensibilité de la souche vaccinale à la réponse IFN-I	56
L'action oncolytique du MV dépend des défauts de la réponse IFN-I	57
<i>Induction de la réponse antitumorale par le MV</i>	59
Mort immunogène	59
Activation des cellules présentatrices d'antigènes	59
Migration et fonctions effectrices des lymphocytes T	60
Modification du microenvironnement tumoral	61
<i>Essais cliniques du MV</i>	62
OBJECTIFS ET PRINCIPAUX RESULTATS DE LA THESE	65
RÉSULTATS	67
ABSTRACT	71
INTRODUCTION	73
MATERIALS AND METHODS	75
RESULTS	79
DISCUSSION	91
APPENDIX	93
REFERENCES	95
SUPPLEMENTAL FIGURES	99
DISCUSSION	105
REMISE EN CONTEXTE DES PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS	107
LE MPM ORIENTE LE PHENOTYPE DES CELLULES DERIVEES DE MONOCYTES	108
LE TME INTERFERE AVEC L'EXPRESSION DU TRANSGENE VIRAL	111
L'INFECTION PAR LE MV INDUIT UNE REPOSE PRO-INFLAMMATOIRE DANS LE TME	114
PERSPECTIVES	117
CONCLUSION	119
BIBLIOGRAPHIE	121
ANNEXES	149
LISTE DES COMMUNICATIONS REALISEES AU COURS DE LA THESE	151
LISTE DES PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES	153

LISTE DES ABREVIATIONS

ADCC	cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps
ALR	<i>AIM2-like receptors</i>
Angio-TAM	<i>pro-angiogenic TAM</i>
APOBEC3G	<i>apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3G</i>
BAP1	<i>BRCA1-associated protein 1</i>
BiTE	<i>bispecific T cell engager</i>
Breg	lymphocyte B régulateur
C	facteur de virulence du MV
CAF	<i>cancer associated fibroblast</i>
CCL4	<i>C-C motif chemokine ligand 4</i>
CCR2	<i>C-C motif chemokine receptor 2</i>
CD	cluster de différenciation
cDC	cellule dendritique conventionnelle
CDKN2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CEA	<i>carcinoembryonic antigen</i>
cGAMP	<i>cyclic GMP-AMP</i>
cGAS	<i>cGAMP synthase</i>
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CSF1R	<i>colony stimulating factor 1 receptor</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4</i>
CXCL2	<i>C-X-C motif chemokine ligand 2</i>
CXCR4	<i>C-X-C motif chemokine receptor 4</i>
DAMP	motifs moléculaires associés aux dégâts
DC	cellule dendritique
DDIT4	<i>DNA Damage inducible transcript 4</i>
EGF	<i>endothelial growth factor</i>
eIF4E	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
F	glycoprotéine de fusion du MV
FLT3L	<i>FMS-related tyrosine kinase 3 ligand</i>
FOXP3	<i>forkhead box P3</i>

Liste des abréviations

GBP2/5	<i>Guanylate Binding Protein 2 and 5</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
GPNMB	<i>glycoprotein Nmb</i>
H	hémagglutinine du MV
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HMGB1	<i>high mobility group protein B1</i>
HSP70	<i>heat shock protein 70</i>
HSV-1	alphaherpesvirus humain 1
IDO	indoléamine2,3-dioxygénase
IFITM1	<i>interferon induced transmembrane protein 1</i>
IFN	interféron
IFNAR	<i>Interferon-alpha/beta receptor</i>
IFN-TAM	<i>interferon-primed TAM</i>
IGF-I	<i>insulin-like growth factor-I</i>
IL	interleukine
Inflam-TAM	<i>inflammatory cytokine enriched TAM</i>
IPCI	inhibiteur de point de contrôle immunitaire
IRF4	<i>interferon regulatory factor 4</i>
ISG	gènes stimulés par les interférons
ISGF3	<i>Interferon-stimulated gene factor 3</i>
JAK1	<i>Janus kinase 1</i>
KDEL2	<i>KDEL endoplasmic reticulum protein retention receptor 2</i>
L	protéine large du MV
LA-TAM	<i>lipid-associated TAM</i>
LGP2	<i>laboratory of Genetics and Physiology 2</i>
M	protéine de matrice du MV
MACHETE	<i>molecular alteration of chromosomes with engineered tandem elements</i>
MAFB	<i>MAF BZIP transcription factor B</i>
MAVS	<i>Mitochondrial Antiviral Signaling protein</i>
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MCTS	Modèle de culture en sphéroïdes multicellulaires
MDA5	<i>melanoma differentiation associated gene 5</i>
MDSC	<i>myeloid derived suppressor cells</i>

MEC	matrice extracellulaire
MV	virus de la rougeole
MIBE	<i>measles inclusion-body encephalitis</i>
MPM	mésothéliome pleural malin
MTAP	méthylthioadénosine phosphorylase
MX1	<i>MX dynamin like GTPase 1</i>
N	nucléoprotéine du MV
NAP	<i>neutrophil-activating protein</i>
NF2	<i>neurofibromatose 2</i>
NFκB	<i>nuclear factor-kappa B</i>
NIS	symporteur d'iodure de sodium
NK	cellules <i>natural killer</i>
NO	oxyde nitrique
NOS	<i>nitric oxide synthase</i>
OAS1	<i>2'-5'-oligoadenylate synthase 1</i>
OV	virus oncolytique
P	phosphoprotéine du MV
PAMP	motifs moléculaires associés aux pathogènes
PD1	<i>programmed cell-death 1</i>
pDC	cellule dendritique plasmacytoïde
PDL1	<i>Programmed cell Death-Ligand 1</i>
PGE₂	prostaglandine E2
PKR	Protéine kinase R
Prolif-TAM	<i>proliferating TAM</i>
PRR	<i>pathogen recognition receptor</i>
RdRp	complexe ARN polymérase ARN dépendante
Reg-TAM	<i>immune regulatory TAM</i>
RIG-I	<i>Retinoic acid inducible gene I</i>
RLR	<i>RIG-I-like receptors</i>
RNP	complexe ribonucléoprotéique
ROS	espèces réactives de l'oxygène
RTM-TAM	<i>resident tissue macrophages-like TAM</i>
SLAM	<i>Signaling Lymphocytic Activation Molecule</i>
SSPE	<i>subacute sclerosing panencephalitis</i>

Liste des abréviations

STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
STING	<i>stimulator of IFN genes</i>
TAA	antigènes associés aux tumeurs
TAM	macrophages associés aux tumeurs
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TCID50	<i>Median tissue culture infectious dose</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TGF-β	<i>tumor growth factor beta</i>
Th1	lymphocytes T CD4 <i>helper</i> de type 1
TIGIT	<i>T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domain</i>
TIM3	<i>T cell immunoglobulin mucin receptor 3</i>
TLR	<i>toll-like receptors</i>
TME	microenvironnement tumoral
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TNFR	<i>TNF receptor</i>
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
Treg	lymphocytes T CD4 régulateurs
TRIM25	<i>Tripartite motif-containing protein 25</i>
T-VEC	talimogene laherparepvec
TYK2	<i>tyrosine kinase 2</i>
V	facteur de virulence du MV
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VSV	virus de la stomatite vésiculaire
XCL1	<i>XC-chemokine ligand 1</i>

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Composition du microenvironnement tumoral.....	17
Figure 2 Différenciation des cellules dérivées de monocytes.....	20
Figure 3 Fonctions protumorales des TAM.	23
Figure 4 Délétions homozygotes de la région p21.3 du chromosome 9 dans le MPM.	34
Figure 5 Composition en cellules immunitaires du MPM.....	35
Figure 6 Mécanisme d'action des virus oncolytiques.....	38
Figure 7 Déterminants du tropisme des virus oncolytique pour les cellules tumorales.....	40
Figure 8 La réponse IFN-I.	42
Figure 9 Activation de la réponse immunitaire dirigée contre les cellules cancéreuses par les virus oncolytiques.	46
Figure 10 Le virus de la rougeole (MV).....	52
Figure 11 Cycle de réplication du MV.	54
Figure 12 Défauts de la réponse IFN-I dans le MPM permettant l'action oncolytique du MV.....	58
Figure 13 Résumé graphique du travail de thèse.	119

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Essais cliniques de phase I/II du MPM.....	50
Tableau 2 Essais cliniques testant le MV oncolytique.....	64

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Luc Willems et le Dr Branka Horvat pour avoir accepté d'être rapporteurs de mes travaux de thèse ainsi que le Dr Nadine Gervois d'avoir accepté d'être examinatrice.

Je dois aux membres de mon comité de thèse, le Dr David Gilot et le Dr Sophie Barillé, ainsi qu'au Dr Aurélien Sérandour, de chaleureux remerciements. Vos conseils m'ont permis d'aborder sous de nouveaux angles les difficultés rencontrées lors de ma thèse et je suis ressortie de chacun de nos échanges avec de nouvelles idées.

Mes sincères remerciements vont également à tout le personnel des plateformes de recherche avec lesquels j'ai eu la chance de collaborer. Je remercie en particulier le Dr Nicolas Jouand pour sa disponibilité et son infinie patience face à mes questions.

De nombreuses personnes de l'équipe ont participé aux travaux présentés dans ce manuscrit. Ce projet doit énormément à Laurine Berland dont l'implication et la bonne humeur ont été une vraie source d'inspiration. Merci aussi à Joëlle et bien sûr Judith pour votre incomparable soutien technique et scientifique. Marion, merci d'avoir été là au tout début de ce projet et de m'avoir tant appris. Merci Maureen, Morganes, Tina et Ugo d'avoir toujours pris le temps de vous brûler les yeux sur les premières versions de mes figures. Tacien, tu mérites bien une phrase pour toi tout seul. Merci également à Christophe, Delphine, Lucas et Nicolas pour vos retours si constructifs sur le papier.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à tous les membres de l'équipe 1 du CRIC2NA, dont Manon, qui ont été de merveilleux collègues. Votre soutien, votre enthousiasme et votre amitié ont rendu ces dernières années mémorables.

Enfin, je remercie mon directeur de thèse, le Dr Jean-François Fonteneau sans qui ce projet n'aurait pas eu lieu. Merci de m'avoir laissé cette si grande liberté d'initiative au cours de mon master puis ma thèse et d'avoir à chaque fois répondu présent pour me motiver à aller de l'avant lors des moments difficiles. Merci enfin pour l'aide précieuse que tu m'as apporté ces deux derniers mois. Merci pour les chouquettes aussi.

INTRODUCTION



En France, environ 1200 nouveaux cas de cancers sont détectés par jour. Il s'agit de la première cause de mortalité en France avec près de 150 000 décès par an. Les cancers se caractérisent par la multiplication et la propagation anarchique de cellules anormales. Au cours de leur transformation en cellules cancéreuses, celles-ci adoptent des caractéristiques particulières appelées « *hallmarks of cancer* »¹. Ces « *hallmarks* » mettent en évidence que, si les modifications génétiques des cellules cancéreuses sont nécessaires à l'initiation du cancer, la présence d'un environnement de support est essentielle à leur maintien. Ce microenvironnement tumoral (TME) est central dans la modification de l'homéostasie tissulaire, permettant la prolifération de cellules cancéreuses, mais aussi dans l'invasion, la migration et la formation de métastases. De plus, il joue un rôle décisif dans l'échappement immunitaire des cellules cancéreuses et les protègent contre les effets de nombreux traitements.

Les principales options thérapeutiques ciblent les « *hallmarks* » du cancer pour induire directement la mort des cellules cancéreuses ou pour les priver des avantages apportés par leur microenvironnement de support. L'immunothérapie oncolytique se situe à l'interface entre ces deux approches. Elle utilise des virus pour induire la mort des cellules cancéreuses tout en bouleversant le microenvironnement tumoral afin de rediriger le système immunitaire du patient contre la tumeur.

Les travaux de cette thèse participent à la caractérisation de l'action oncolytique du virus atténué de la rougeole dans le microenvironnement tumoral du mésothéliome pleural malin. Dans cette introduction je présente dans un premier temps la complexité du TME en mettant en avant son rôle dans la progression tumorale. J'introduis ensuite les caractéristiques propres au mésothéliome pleural malin, un cancer rare et agressif de la plèvre pour lequel nous développons cette thérapie. J'explique ensuite comment les virus oncolytiques sont capables d'induire une réponse immunitaire antitumorale et de moduler le TME. Enfin je résume l'état des connaissances sur les mécanismes sous-tendant l'activité oncolytique et immunostimulatrice du MV.

LE MICROENVIRONNEMENT TUMORAL

COMPOSITION ET HETEROGENEITE DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL

Le microenvironnement tumoral (TME) est un système complexe et structuré faisant intervenir de nombreuses cellules non cancéreuses dans une matrice altérée et vascularisée (Figure 1). La composition et les fonctions du TME dépendent de nombreux facteurs et sont très hétérogènes d'un patient à l'autre, y compris dans des types de cancers identiques ²⁻⁴. Celles-ci dépendent de l'organe atteint, de l'origine des cellules présentes dans la tumeur, de leur distribution spatiale et du moment de leur recrutement au site tumoral. Différentes tumeurs présentent donc des proportions variables de cellules immunitaires, de cellules stromales ainsi que de protéines de la matrice extracellulaire (MEC). Ces composants sont capables, la plupart du temps, d'exercer des actions à la fois antitumorales et protumorales. Les fonctions des cellules du TME sont alors déterminées par les signaux paracrine, mais aussi les contacts cellulaires auxquels elles sont sujettes. Cette partie de ma thèse décrit les différents composants impliqués, avec un intérêt particulier pour l'infiltrat immunitaire, ainsi que leurs fonctions.

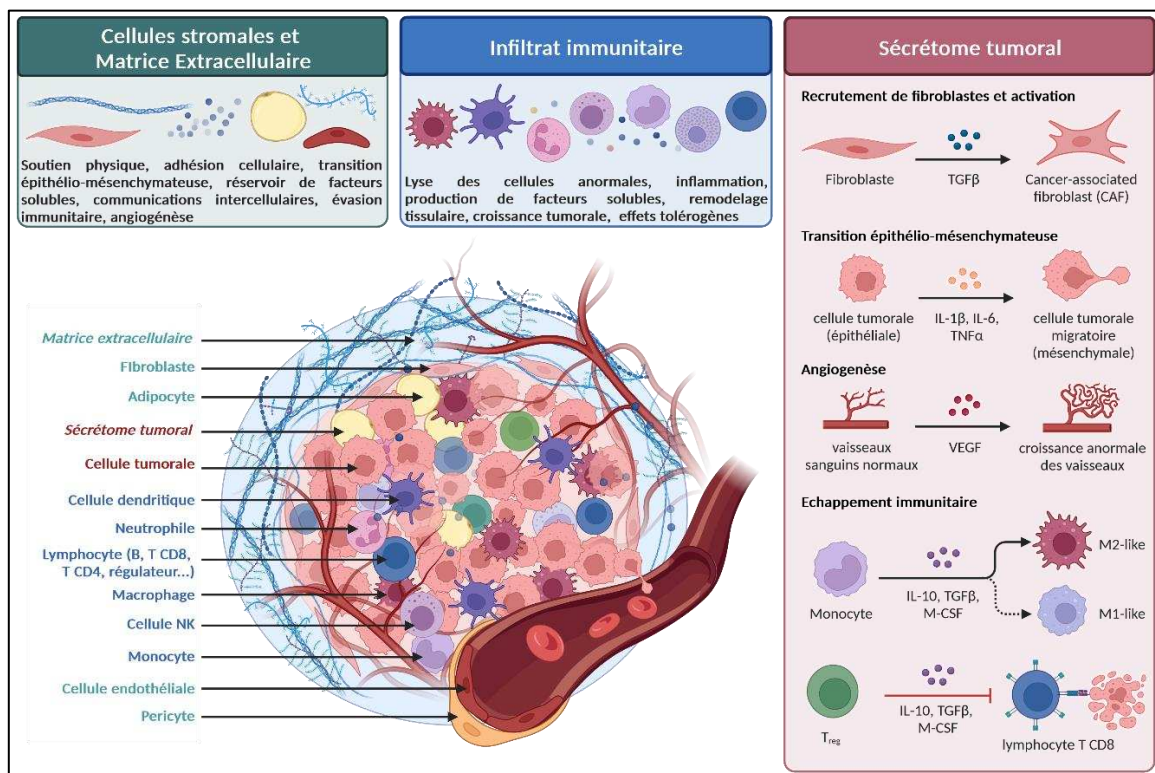


Figure 1 | Composition du microenvironnement tumoral. La matrice extracellulaire et les nombreux types cellulaires recrutés ou modifiés par la diffusion du sécrétome des cellules tumorales soutiennent la progression de la tumeur. IL, interleukine ; M1/2-like, macrophages associés aux tumeurs de type M1/2 ; M-CSF, *macrophage colony-stimulating factor* ; TGF-β, *transforming growth factor β* ; TNF-α, *tumor necrosis factor α* ; Treg, lymphocyte T régulateur ; VEGF, *vascular endothelial growth factor*.

LES CELLULES STROMALES ET LA MATRICE

Le TME est une structure organisée et extrêmement modulable en fonction des besoins des cellules cancéreuses. Lors de l'initiation de la tumeur, les cellules anormales sont capables de profiter des fonctions des cellules déjà présentes dans le stroma, mais aussi de les reprogrammer.

Les fibroblastes sont le type cellulaire majoritaire de nombreux tissus. Ils sont dotés d'une très grande plasticité. Sous l'influence des signaux émis par les cellules cancéreuses, ils se différencient en *cancer associated fibroblasts* (CAF). La diversité des sous-types induits leur permet d'avoir de nombreuses fonctions aux effets parfois opposés ⁵. Ils sont responsables de la synthèse et du remodelage de la MEC et impactent par conséquent de nombreux mécanismes tels que l'angiogenèse ou l'invasion tumorale. En modifiant les propriétés mécaniques de la MEC, ils altèrent le comportement des cellules cancéreuses, mais aussi des cellules immunitaires et peuvent contribuer à l'échappement immunitaire des cellules tumorales. Par exemple, ils peuvent exercer un rôle de barrière infranchissable autour des cellules tumorales pour limiter l'infiltration de lymphocytes T ⁶. Ils communiquent également avec les autres cellules du TME de manière paracrine ou dépendante de contact cellulaire. Ils sont notamment un des principaux producteurs de *tumor growth factor beta* (TGF- β), une cytokine réprimant fortement l'activité cytotoxique des cellules immunitaires et favorisant la prolifération tumorale.

D'autres cellules résidentes jouent un véritable rôle de support pour la croissance tumorale comme les adipocytes, les cellules nerveuses, les péricytes, les cellules endothéliales et lymphatiques. Leurs fonctions protumorales et antitumorales ne seront pas abordées dans cette thèse, mais sont très bien décrites dans la revue de Visser et Joyce ⁷.

Ces cellules sont organisées au sein de la MEC composée de protéines fibreuses telles que du collagène, des glycoprotéines ou des protéoglycanes ⁷. Il s'agit d'une structure dynamique remodelée par les protéases produites par les différents types cellulaires du TME. La MEC favorise la communication intercellulaire en servant de réservoir de molécules de signalisation séquestrées et libérées par l'action des protéases. Elle sert également de support pour l'adhésion cellulaire et la migration ⁸ et permet d'isoler la tumeur vis-à-vis du système immunitaire ⁹.

LES CELLULES DE L'INFILTRAT IMMUNITAIRE

Lors de la transformation d'une cellule saine en cellule cancéreuse, les mutations génèrent de nouveaux antigènes, appelés néo-antigènes, qui peuvent être reconnus par le système immunitaire adaptatif. De plus, les signaux de dangers émis par le TME permettent le recrutement de cellules de l'immunité innée. Dès l'initiation de la tumeur, le TME peut donc être infiltré par une importante composante immunitaire qui a pour vocation d'éradiquer les cellules anormales.

Les cellules de l'immunité innée

La réplication anarchique des cellules cancéreuses induit une dégradation tissulaire et la libération de motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMP) ¹⁰. De plus, leurs altérations activent des voies de signalisation antivirales telles que la réponse interféron de type I (IFN-I) ou les dirigent vers une mort inflammatoire produisant de l'interleukine (IL)-1 β et de l'IL-6 ¹¹. Cela induit un TME inflammatoire qui recrute et polarise de nombreuses cellules de l'immunité innée comme les monocytes sanguins ⁷. Dans les tissus, ceux-ci peuvent se différencier en macrophages et en cellules dendritiques (DC) (Figure 2). Ces deux types cellulaires sont aussi recrutés directement au site tumoral par chimiotactisme. Les signaux inflammatoires attirent également de nombreux neutrophiles. En fonction de leur état de maturation, ces derniers ont des fonctions protumorales ou antitumorales. Ils forment, avec les monocytes immatures, une catégorie de cellules myéloïdes appelées *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) aux propriétés particulièrement immunosuppressives ¹². Leur persistance dans la tumeur est corrélée avec une mauvaise survie des patients. D'autres cellules de l'immunité innée composent le TME comme les mastocytes ou les éosinophiles ⁷. Dans l'ensemble, toutes ces cellules participent au remodelage de la MEC, à la régulation des autres populations immunitaires et produisent des cytokines protumorales ou antitumorales. Lors de ma thèse, je me suis particulièrement intéressée aux monocytes ainsi qu'aux macrophages et aux cellules dendritiques qui en sont dérivés.

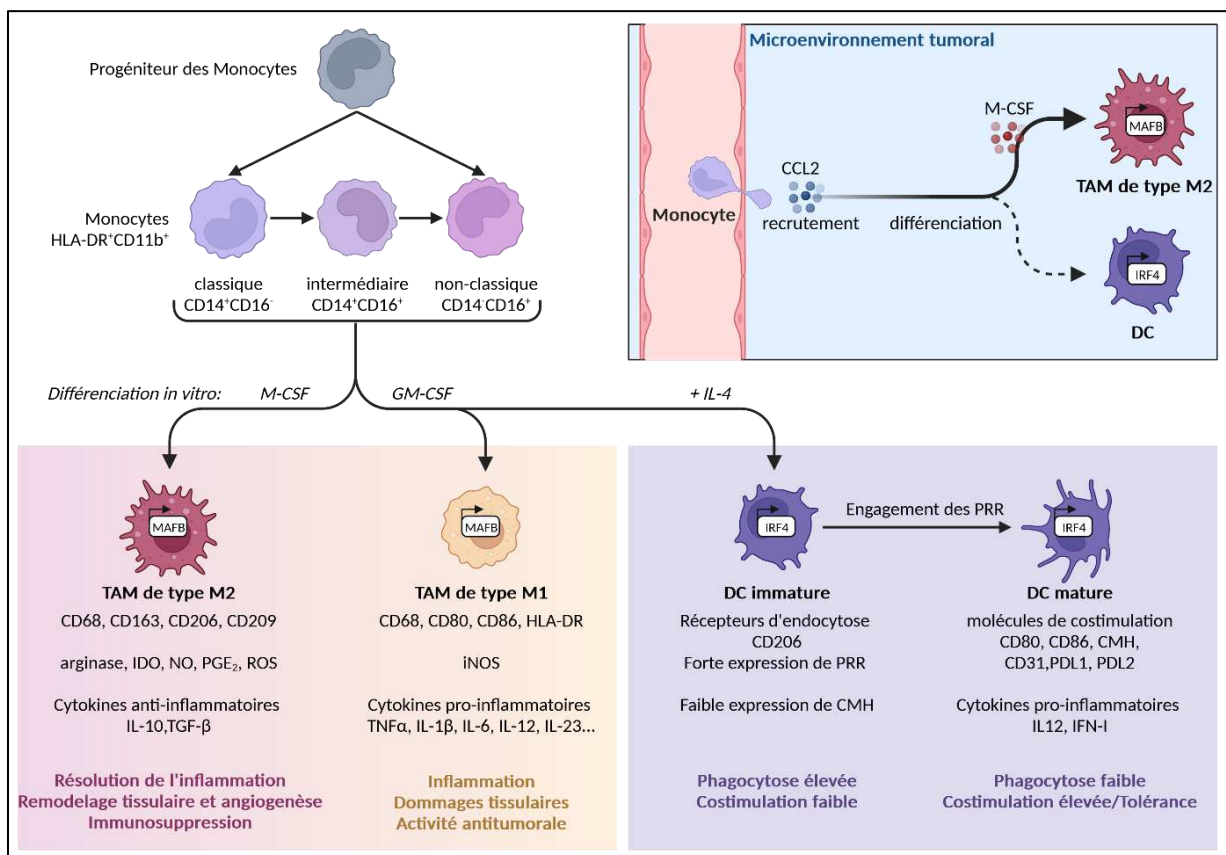


Figure 2 | Différenciation des cellules dérivées de monocytes. Les monocytes forment une population hétérogène dérivée d'un même progéniteur. Leur différenciation en macrophages ou en DC est dirigée par les facteurs de transcription MAFB ou IRF4 respectivement. La culture de monocytes *in vitro* avec du M-CSF, du GM-CSF ou du GM-CSF avec de l'IL-4 les différencie respectivement en macrophages de type M2, en macrophages de type M1 ou en DC immatures. Dans le TME, la plupart des monocytes ont un phénotype classique. Ils sont recrutés par la présence de CCL2. La concentration élevée en M-CSF dans les tumeurs leur fait majoritairement adopter un phénotype de type M2. CMH, complexe majeur d'histocompatibilité (HLA) ; IDO, indoléamine 2,3-dioxygénase ; IFN, interféron ; IL, interleukine ; iNOS, *inductible nitric oxide synthase* ; NO, *nitric oxide* ; PDL, *programmed death-ligand* ; PGE₂, prostaglandine E₂ ; PRR, *pathogen recognition receptor* ; ROS, espèces réactives de l'oxygène ; TNF- α , *tumor necrosis factor α* ; TGF- β , *tumor growth factor β* .

Les monocytes

Les monocytes sont produits dans la moelle osseuse puis pénètrent la circulation sanguine où ils représentent 2 à 10% des leucocytes. Bien qu'ils présentent un continuum phénotypique, ils sont souvent répartis en trois grands sous-types : "classique" (cluster de différenciation (CD)14+CD16-), "intermédiaire" (CD14+CD16+) ou "non-classique" (CD14-CD16+) ^{13,14}. Les sous-types "intermédiaire" et "non-classique" sont retrouvés dans les tissus adjacents de nombreux cancers, mais la plupart des monocytes infiltrant les tumeurs possèdent un phénotype "classique". Ils sont aussi appelés inflammatoires, car, par rapport aux monocytes sanguins, ils sécrètent davantage d'IL-1 β , de *C-C motif chemokine ligand 4* (CCL4), de *C-X-C motif chemokine ligand 2* (CXCL2), de *C-X-C motif chemokine receptor 4* (CXCR4) et d'autres cytokines inflammatoires ¹⁵. De même, ils expriment davantage de facteurs de croissance cellulaires, de facteurs de signalisation nucléaire et de marqueurs spécifiques des tissus. Tous les monocytes humains expriment en plus le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)-II HLA-DR et l'intégrine α M (CD11b) ¹⁴.

Les monocytes sont des cellules particulièrement versatiles qui s'adaptent aux signaux des tissus dans lesquels ils sont recrutés ¹⁴. Ils servent ainsi à l'homéostasie tissulaire en se différenciant en macrophages, en cellules dendritiques ou en ostéoclastes ainsi qu'à la clairance des pathogènes ^{14,16,17}.

Les monocytes sont attirés dans les tumeurs par l'hypoxie et les molécules chimio-attractrices du TME, notamment CCL2 ^{14,18,19}. Sous l'influence des signaux reçus, ils peuvent exprimer les facteurs de transcription *MAF BZIP transcription factor B* (MAFB) et *interferon regulatory factor 4* (IRF4) qui conduisent respectivement leur différenciation en macrophages ou en cellules dendritiques ^{16,20}. Les monocytes sont capables d'induire la mort des cellules tumorales grâce à leur production de facteurs solubles ou grâce au mécanisme de cytotoxicité à médiation

cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) et de les phagocyter ¹⁴. En raison des nombreux signaux du TME, il est cependant très difficile d'attribuer ces fonctions aux monocytes eux-mêmes ou aux cellules qui en sont dérivées. Toutefois, un modèle de coculture de cellules tumorales avec des monocytes issus de donneurs sains a mis en évidence la toxicité des monocytes *in vitro* ²¹. Cet article montre notamment que le transcriptome des monocytes est inchangé après 24h de coculture et soutient l'hypothèse d'une cytotoxicité des monocytes indépendante de leur différenciation. Au sein du TME, les monocytes sont également impliqués dans le remodelage de la MEC, l'interaction avec d'autres cellules immunitaires, l'angiogenèse et l'invasion des cellules cancéreuses ¹⁴.

Les macrophages

Fonctions des macrophages

En situation physiologique, les macrophages ont un rôle de sentinelle et sont responsables de la clairance des cellules apoptotiques issues notamment du renouvellement tissulaire ²². Dans un contexte inflammatoire, ils prolifèrent et produisent un grand nombre de molécules chimiotactiques pour recruter d'autres cellules immunitaires (monocytes, neutrophiles, cellules lymphoïdes) et diriger leur activation, leur différenciation et leur polarisation. Ils ont également un rôle de support pour réparer les tissus abimés en permettant la régénération des cellules épithéliales et le maintien de cellules souches. Leurs fonctions qui peuvent être inflammatoires ou pro-résolutives les distinguent respectivement en macrophages de type M1 ou de type M2 ²³.

Recrutement et classification des macrophages associés aux tumeurs

Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) représentent le type cellulaire de l'immunité innée le plus abondant dans le TME. Ils peuvent provenir de macrophages déjà résidents dans le tissu, mais sont en majorité issus de la différenciation de monocytes sanguins ^{20,24}. Ceux-ci sont recrutés et activés sur le site de la tumeur par la présence de *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF), de CCL2, de *vascular endothelial growth factor* (VEGF), de *tumor necrosis factor* (TNF)- α , et de la sémaphorine 3A ²⁵. Leur présence dans la tumeur est en général associé à un mauvais pronostic et une piètre réponse thérapeutique ²⁴⁻²⁶. La déplétion, l'inhibition ou la reprogrammation de ces cellules dans des modèles murins est capable de ralentir le développement de plusieurs cancers et d'améliorer l'effet de nombreuses thérapies ^{14,26-31}. Il arrive cependant que dans certains cas, leur abondance corrèle avec une meilleure survie ³².

Cette ambivalence pronostique s'explique du fait de leur très grande diversité phénotypique au sein du TME. Ce sont des cellules très plastiques ce qui rend particulièrement compliquée leur classification ¹³. Pendant longtemps, ils ont été définis, sur la base des fonctions retrouvées en conditions physiologiques, comme antitumoraux (TAM de type M1) ou

protumoraux (TAM de type M2) ²³. Les TAM de type M1 se caractérisent par l'expression des récepteurs CD68, CD80, CD86, du CMH-II ainsi qu'une expression élevée d'iNOS, un précurseur de la *nitric oxide synthase* (NOS), de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-12, l'IL-23 et le TNF- α ^{25,33,34}. La sécrétion d'IL-12 favorise notamment le développement de la réponse lymphocytaire Th1 et cytotoxique ³⁵. A l'inverse, les TAM de type M2 ont un rôle immunosuppresseur et de réparation tissulaire bénéfique à la croissance tumorale. Ils sont caractérisés par l'expression des récepteurs CD68, CD163, CD206 (aussi appelé MRC1) et CD209 ^{25,33,34}. Ils présentent une activité arginase élevée et sécrètent des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF- β qui inhibent la réponse lymphocytaire T CD8.

Pour faciliter le rapprochement avec la littérature, je me suis servie de cette classification au cours de ma thèse. Cependant, elle est imparfaite, car elle ne permet pas d'englober la totalité des populations composant les TAM ³⁶. Idéalement, une classification actualisée des macrophages devrait prendre en comptes des populations aux phénotypes moins conventionnels comme les macrophages exprimant la lectine CD169 ou le *T cell receptor* (TCR). Ceux-ci ont majoritairement un rôle antitumoral et possèdent des fonctions les rapprochant des macrophages de type M1. De plus, les TAM peuvent à la fois exprimer des marqueurs de type M1 comme de type M2 ^{15,37,38}. En réalité, leurs phénotypes sont dictés par le contexte tumoral. On trouve ainsi plusieurs sous-types de macrophages, non seulement entre différentes tumeurs, mais également au sein d'une même tumeur, où ils peuvent avoir des fonctions différentes et parfois même opposées. Étant donné leur rôle majeur dans le TME, de très nombreuses études se sont attachées à caractériser ces TAM. L'utilisation de la transcriptomique en cellule unique a permis d'explorer cette hétérogénéité inter et intratumorale ^{15,37}. En se basant sur les résultats de plusieurs études transcriptomiques, Ma et al. proposent une classification plus fine des TAM dans les tumeurs ¹³. Ils retrouvent entre les cancers sept sous-types qu'ils qualifient sur la base de leurs fonctions présumées de *interferon-primed TAM* (IFN-TAM), *immune regulatory TAM* (Reg-TAM), *inflammatory cytokine enriched TAM* (Inflam-TAM), *lipid-associated TAM* (LA-TAM), *pro-angiogenic TAM* (Angio-TAM), *resident tissue macrophages-like TAM* (RTM-TAM) et *proliferating TAM* (Prolif-TAM). Cette classification est basée sur l'expression des gènes et des voies de signalisations enrichies, ainsi que sur les fonctions prédites des différents types de macrophages ¹³. Dans la plupart des tumeurs toutefois, les TAM adoptent des fonctions qui supportent la progression tumorale et qui se rapprochent donc de celles des macrophages de type M2 ³⁴.

Fonctions des macrophages associés aux tumeurs

Les fonctions cytotoxiques des macrophages sont retrouvées pour les TAM au début de l'initiation tumorale ou lors de stimulation avec des anticorps ³⁴. Les TAM peuvent alors médier la mort des cellules, induire l'ADCC et phagocyter les cellules cancéreuses pour promouvoir la

réponse immunitaire adaptative. Ils produisent en outre de nombreux médiateurs inflammatoires tels que l'IL-1 β , le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-12 qui contribuent à recruter des cellules immunitaires ^{12,24}.

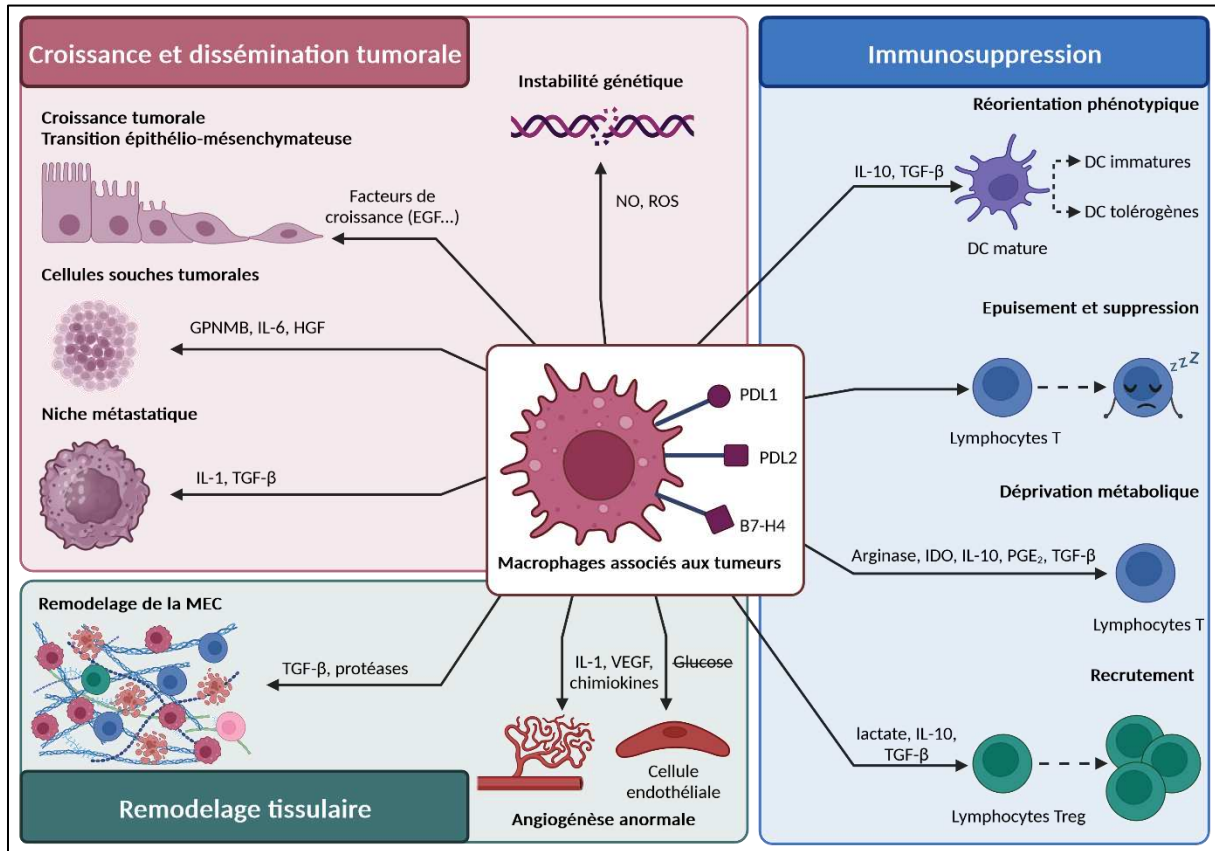


Figure 3 | Fonctions protumorales des TAM. Les TAM agissent aux différents stades de la tumeur par leurs sécrétions de facteurs solubles, leur activité métabolique ainsi que les récepteurs qu'ils expriment. Adapté de Mantovani *et al.*, Nat. Rev. Drug Discov., 2022 ³⁴. DC, cellule dendritique ; EGF, *endothelial growth factor* ; GPNMB, *glycoprotein Nmb* ; HGF, *hepatocyte growth factor* ; IDO, indolamine 2,3-dioxygénase ; IL, interleukine ; NO, oxyde nitrique ; PGE₂, prostaglandine E2 ; ROS, espèces réactives de l'oxygène ; TGF- β , *tumor growth factor* β ; VEGF, *vascular endothelial growth factor*.

D'un autre côté, les TAM sécrètent de nombreux facteurs solubles capables de soutenir la mutagenèse, la prolifération, la survie et les capacités invasives des cellules tumorales ³⁴ (Figure 3). Ce sont les plus gros producteurs d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'oxyde nitrique (NO) du TME induisant une instabilité génétique aux premiers stades de la tumeur ^{39,40}. De plus, ils accompagnent la prolifération cellulaire et la migration en sécrétant de l'*endothelial growth factor* (EGF) ⁴¹. Ils soutiennent le potentiel souche des cellules cancéreuses en produisant de l'*hepatocyte growth factor* (HGF), de *glycoprotein Nmb* (GPNMB) et de l'IL6 ³⁴. Ils favorisent l'apparition de métastases par leur production d'IL-1 et de TGF- β qui sont également impliqués avec les métalloprotéases matricielles et les cathepsines qu'ils sécrètent dans le remodelage de la

MEC, rendant ainsi disponibles des facteurs solubles séquestrés dans la matrice ^{7,34}. Ces facteurs solubles participent à l'angiogenèse anarchique et la perméabilité vasculaire dans la tumeur. L'angiogenèse est également appuyée par la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques, dont du VEGF, par les TAM. Ils participent également à la structure aberrante des vaisseaux par leur consommation très importante de glucose, ce qui limite sa disponibilité pour les cellules endothéliales ^{7,42}. En contrepartie, les TAM libèrent du lactate qui stimule l'exclusion de lymphocytes T CD8 et permet l'accumulation de lymphocytes T CD4 régulateurs (Treg) ²⁴. De plus, ils peuvent dépler des acides aminés essentiels tels que le tryptophane, la cystine et la cystéine ce qui inhibe l'activation des lymphocytes T ^{43,44}. Les TAM induisent une immunosuppression forte dans le TME, en sécrétant de l'IL-10, du TGF- β , des prostaglandines E2 (PGE₂), de l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) et de l'arginase qui promeuvent l'expansion de lymphocytes Treg, l'induction d'un phénotype immature et tolérogène pour les DC ³⁴ ainsi que l'inhibition des fonctions des lymphocytes T CD8 et des cellules NK ^{45,46}. Dans de nombreux cancers, ils surexpriment des points de contrôles immunitaires tels que *Programmed cell Death-Ligand 1* (PDL1), PDL2 et B7-H4 qui induisent l'épuisement et l'anergie des lymphocytes T infiltrés ³⁴. Leur déplétion ou leur reprogrammation réduisent cette anergie et restaurent les réponses antitumorales ³¹.

Ainsi, les TAM sont les cellules de l'immunité innée les plus abondamment trouvées dans les tumeurs. Ils proviennent soit de monocytes soit de macrophages résidents dans les tissus. Ils sont dotés d'une grande plasticité et l'on retrouve en général plusieurs phénotypes au sein du TME. Lorsqu'ils soutiennent la progression tumorale à travers leur action anti-inflammatoire, ils sont qualifiés de TAM de type M2. Ceux-ci promeuvent l'angiogenèse, l'immunosuppression, en servant de support à la création de métastases ou en permettant la résistance aux thérapies. Ils peuvent néanmoins avoir une action antitumorale, notamment lorsqu'ils sont différenciés vers un phénotype de type M1, en phagocytant les cellules cancéreuses et en présentant leurs antigènes ce qui leur permet d'activer la réponse immunitaire adaptative. Ils ont alors des fonctions proches de celles des cellules dendritiques.

Les cellules dendritiques

Classification des cellules dendritiques

Contrairement aux macrophages, les DC sont des cellules présentes en faible quantité dans les tumeurs. Cependant, elles ont un rôle central dans l'initiation de la réponse immunitaire adaptative et la mise en place de mécanismes de tolérance. Elles proviennent de DC résidentes ou lymphoïdes ou bien sont différenciées à partir de monocytes recrutés par CCL2. On différencie notamment les DC plasmacytoïdes (pDC) des DC conventionnelles (cDC) ⁴⁷.

Les DC conventionnelles sont divisées en plusieurs sous-types. Parmi eux, le sous-type cDC1 est impliqué dans la réponse antitumorale et la lutte contre les pathogènes intracellulaires ⁴⁸. La présence de ce sous-type est plutôt associée à un bon pronostic pour le patient ⁴⁹. Elles sont recrutées au site tumoral par la sécrétion de CCL5, *XC-chemokine ligand 1* (XCL1) et *FMS-related tyrosine kinase 3 ligand* (FLT3L) des cellules NK. Les cDC1 produisent des IFN-I et III ainsi que de l'IL-12 en faible quantité. De plus, elles sont très efficaces pour la présentation croisée ou directe des antigènes aux lymphocytes T CD8 et CD4, éduquant alors ces derniers vers un phénotype *helper* de type 1 (Th1).

Les DC plasmacytoïdes ont un rôle phare dans le contrôle des infections virales et la sécrétion d'IFN- I et III ^{50,51}. En général, elles présentent faiblement les antigènes, mais peuvent être stimulées pour faire de la présentation croisée d'antigènes exogènes sur leur CMH-I et activer les lymphocytes T CD8 ⁵². Elles peuvent être tolérogènes, mais ce rôle est faiblement décrit bien que leur présence corrèle avec un mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer ⁴⁹.

D'autres sous-types de DC sont caractérisés et peuvent partager des fonctions ou des marqueurs avec les pDC ou cDC1. Parmi ces sous-types, les DC issues de monocytes sont générées lors d'une inflammation et sont fortement retrouvées dans les tumeurs ²⁰. Elles sont reconnues comme dotées d'une grande plasticité et sont parfois qualifiées de monocytes "non-classiques" ⁴⁹. En 1994, Federica Sallusto et Antonio Lanzavecchia ont montré que la culture *in vitro* de monocytes avec du *granulocyte macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF) et de l'IL-4 permettait l'obtention de cellules dendritiques immatures ⁵³. C'est ce modèle de culture que nous avons utilisé dans notre étude.

Fonctions des cellules dendritiques

Dans un premier temps, les DC sont qualifiées d'immatures, à ce stade elles sont dotées d'une grande capacité d'endocytose et ne sont capables de stimuler les lymphocytes T que très faiblement ^{48,50,54}. Les signaux de dangers, tels que l'engagement de leurs *pathogen recognition receptor* (PRR), conduisent à leur maturation et l'expression de centaines de gènes induisant des changements morphologiques, phénotypiques et fonctionnels. Ceux-ci diminuent leurs capacités phagocytaires au profit de leurs capacités de costimulation. Dès lors, les DC matures sont capables d'amorcer la réponse antitumorale des lymphocytes T. Elles présentent des antigènes associés aux tumeurs (signal 1), exposent des molécules de costimulation comme CD80 et CD86 qui se lient au récepteur CD28 des lymphocytes (signal 2) et produisent des facteurs solubles comme de l'IL-12 ou de l'IFN-I (signal 3).

Toutefois, les DC sont également responsables de l'anergie des lymphocytes T en l'absence d'un signal de costimulation ou favorisent l'interaction avec des récepteurs inhibiteurs qui

limitent l'activité effectrice des lymphocytes T ⁴⁹. Par exemple, le récepteur *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4* (CTLA-4) présent sur les lymphocytes T est capable de se lier avec une meilleure affinité que CD28 aux molécules de costimulation CD80 et CD86 des DC ce qui limite l'activation des lymphocytes T. Les récepteurs de rétrocontrôles PDL1 et PDL2 exprimés entre autres par les DC peuvent se lier à *programmed cell-death 1* (PD1) exprimés par les lymphocytes T activés ce qui limite leur prolifération et leur production de cytokines. Enfin, l'expression de CD31 par les DC permet d'éduquer les lymphocytes T CD4 vers un phénotype régulateur plutôt que Th1.

Inhibition des cellules dendritiques dans le microenvironnement

Pour échapper à la réponse antitumorale que les DC induisent, le TME inhibe leur recrutement et leur différenciation en sécrétant de nombreux facteurs solubles ⁴⁹. Par exemple, les cellules tumorales sont capables de limiter l'action de FLT3L en sécrétant du VEGF et d'induire la mort des cellules NK en sécrétant des PGE2 ce qui limite le recrutement et la différenciation des cDC1. De plus, le TME atténue les fonctions antitumorales des DC en limitant la phagocytose, la maturation et leur présentation antigénique et favorise *in fine* leur activité tolérogène ⁴⁹. Par exemple, la libération d'*high mobility group protein B1* (HMGB1) lors de la mort des cellules tumorales stimule la phagocytose des DC. Cependant, la concentration élevée en *T cell immunoglobulin mucin receptor 3* (TIM3) dans le TME permet la capture d'HMGB1 et limite ainsi la détection des cellules tumorales par les DC ⁵⁵. De plus, l'expression d'IL-10, TGF- β , IL-6 ou de VEGF limite la maturation des DC et induit un programme transcriptomique immunosuppresseur dans les DC ⁴⁹. Par exemple, le TME peut induire la surexpression par les DC de l'enzyme IDO, capable de dépléter le tryptophane et ainsi de limiter sa disponibilité ⁵⁶. Cela soutient leur activité tolérogène en inhibant la prolifération et les fonctions effectrices des lymphocytes T CD8, des cellules NK et en favorisant la différenciation des lymphocytes Treg.

En conclusion, les DC, bien que peu nombreuses dans le TME, ont un rôle majeur dans la promotion de la réponse immunitaire antitumorale. Pour essayer de limiter leur activité, les cellules cancéreuses mettent en place des systèmes de séquestration et de régulation ^{47,49}. Un des champs de l'immunothérapie consiste donc à trouver des stratégies pour protéger et améliorer leurs capacités au sein de la tumeur.

Les cellules de l'immunité adaptative

Les antigènes associés aux tumeurs (TAA) sont reconnus par les lymphocytes T CD8 qui sont les principaux effecteurs antitumoraux. Après l'engagement du TCR par des complexes CMH/peptides, ils exercent une action cytotoxique en libérant de la perforine et du granzyme B, ou par la voie Fas/FasL. Néanmoins, le manque de signaux de costimulation dans les tumeurs ou

la surexpression de points de contrôle immunitaires, comme PDL1 induit leur anergie voire leur apoptose. Une des avancées majeures de la thérapie des cancers consiste à utiliser des inhibiteurs de ces points de contrôle immunitaires (IPCI) ce qui permet de lever leur immunosuppression ⁵⁷. De plus, comme dans certaines infections chroniques, l'épuisement des lymphocytes T CD8 dans les tumeurs peut les rendre dysfonctionnels ^{57,58}.

Pour soutenir la réponse cytotoxique, le recrutement des lymphocytes T CD8 s'effectue en parallèle de celui de lymphocytes T CD4 *helper*. Ceux-ci peuvent se différencier vers un phénotype Th1 antitumoral qui soutient l'action des lymphocytes T CD8 et des lymphocytes B. Il a été montré chez la souris que les lymphocytes T CD4 Th1, grâce à la voie CD40/CD40L, permettent aux DC de réaliser le *priming* des lymphocytes T CD8 qui acquièrent alors des fonctions cytotoxiques ⁵⁹. Les Th1 sécrètent de l'IFN- γ ce qui augmente les voies de présentation du CMH des cellules tumorales et leur reconnaissance par les lymphocytes T CD8. Ils produisent de l'IL-2 qui est nécessaire à la prolifération des lymphocytes. Ils sécrètent également du TNF- α capable d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses. Les lymphocytes T CD4 peuvent aussi se différencier vers un phénotype Th2 qui exerce un rôle plutôt protumoral en sécrétant des molécules anti-inflammatoires ⁶⁰. Des lymphocytes T CD4 régulateurs exprimant *forkhead box P3* (FOXP3) peuvent également être recrutés. Ils suppriment très fortement l'immunité antitumorale notamment par leur sécrétion d'IL-10 et de TGF- β ⁶¹.

Des lymphocytes B sont parfois retrouvés dans le TME et sont en général associés à un bon pronostic ⁶²⁻⁶⁴. Ils sont habituellement retrouvés dans des organes lymphoïdes tertiaires adjacents ou en marge de la tumeur. Ils soutiennent l'immunité adaptative en produisant des anticorps qui reconnaissent des TAA et peuvent présenter ces antigènes aux lymphocytes T. Ils peuvent lyser les cellules tumorales par ADCC et activer le système du complément. Leur sécrétion d'anticorps renforce l'immunité innée en stimulant la phagocytose des cellules tumorales et soutient la machinerie de présentation antigénique. Ils peuvent toutefois être responsables de la sécrétion de molécules anti-inflammatoires comme l'IL-10 et de facteurs pro-angiogéniques qui permettent la croissance tumorale. Une partie de ces lymphocytes sont régulateurs (Breg) et sont impliqués dans la tolérance de la tumeur ^{65,66}.

L'infiltrat immunitaire du TME comprend en outre de nombreuses cellules à l'interface entre l'immunité innée et adaptative. Par exemple, les cellules *natural killer* (NK) sont des lymphocytes qui ne reconnaissent pas un antigène spécifique, mais qui exercent une action cytotoxique sur les cellules qui n'expriment pas de CMH-I. Ce défaut est fréquemment retrouvé sur les cellules cancéreuses ce qui permet de limiter leur expression de TAA. L'infiltration de NK dans la tumeur est alors de bon pronostic pour le patient. Cependant, les cellules cancéreuses sont capables de leur échapper en augmentant l'expression de récepteurs inhibiteurs qui diminuent

leur cytotoxicité et en mobilisant des cellules immunosuppressives comme des MDSC ou des lymphocytes Treg ⁶⁷.

La présence d'autres cellules comme les cellules invariant NKT, les lymphocytes $T\gamma\delta$ ou les cellules innées lymphoïdes est discutée plus avant dans la revue de Visser et Joyce ⁷. Toutes ces cellules peuvent avoir des effets antitumoraux comme protumoraux en fonction du contexte médié par le TME.

SUPPORT DE LA PROGRESSION TUMORALE

Le dialogue des cellules tumorales avec les cellules adjacentes, les nombreux métabolites qu'elles produisent ainsi que l'environnement hypoxique à faible pH qu'elles induisent, transforment le stroma en TME de support ⁷. Celui-ci soutient l'activité métabolique élevée des cellules cancéreuses en leur apportant de l'oxygène et des nutriments. Il induit également une inflammation localisée qui ne se résorbe pas et dont découle une immunosuppression du système immunitaire. En effet, les cellules cancéreuses et le TME jouent sur les mécanismes de régulation conçus pour limiter l'emballement du système immunitaire dans ces conditions.

L'INFLAMMATION DU TME

L'inflammation est un processus présent à tous les stades de la progression tumorale. L'accumulation de cellules myéloïdes participe à l'initiation de la tumeur en induisant un environnement favorable à la mutagenèse dû à la sécrétion de ROS et NO ³⁹. Celles-ci sont capables d'endommager de nombreuses biomolécules comme les protéines, les lipides ou encore l'ADN. De plus, à l'échelle épigénétique, l'activation constante de la machinerie cellulaire par l'IL-6, le TNF- α et l'IL-1 β module l'expression d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs ⁴⁰. L'inflammation peut, en outre, affaiblir le tissu et exposer les niches de cellules souches à ces signaux mutagènes. Enfin, l'inflammation participe à la sélection de clones tumoraux en activant des voies de signalisation « pro-survie » comme celles impliquant les protéines *nuclear factor-kappa B* (NF κ B) et *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3).

De plus, l'inflammation participe à la croissance tumorale, car les molécules inflammatoires, comme le TNF- α , l'EGF ou l'IL-6, servent de facteurs de croissance en stimulant les signaux de survie malgré le manque de nutriments et l'hypoxie ⁴⁰. Elles sont ainsi capables de participer à la sélection de clones tumoraux plus résistants. Ces molécules inflammatoires peuvent aussi diriger le phénotype des cellules du TME. Elles stimulent notamment l'angiogenèse et le recrutement de cellules stromales et myéloïdes ⁷. Celles-ci libèrent des métalloprotéases matricielles qui remodelent la MEC.

Pour promouvoir l'établissement de métastases, certaines cytokines, comme les TNF et l'IL-1 β , induisent l'expression de facteurs déclenchant la transition épithélio-mésenchymateuse ⁷. De plus, l'IL-1 β est impliquée dans le recrutement de fibroblastes producteurs de TGF- β ce qui supporte l'invasion tumorale et l'échappement immunitaire.

Les nombreux signaux de l'inflammation permettent le recrutement de cellules de l'immunité, mais exercent un rétrocontrôle fort pour éviter un emballement du système immunitaire. Par exemple, ils conditionnent les lymphocytes T CD4 vers des phénotypes Th2 et conduisent à l'accumulation de cellules myéloïdes aux phénotypes immunosuppresseurs ⁷. Ainsi, les 15 à 20% des cancers advenant à la suite d'une inflammation chronique, profitent d'un environnement mutagène et d'une immunosuppression déjà en place ⁴⁰. Un exemple représentatif de ce cas de figure est l'inflammation chronique due à la persistance de fibres d'amiantes dans la plèvre pulmonaire. En effet, ces fibres ne sont pas dégradées lors de la phagocytose par les macrophages ce qui conduit à leur mort et la libération d'un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires. L'inflammation chronique de la plèvre qui en découle peut conduire à l'apparition d'un mésothéliome pleural malin (MPM) ⁶⁸.

L'IMMUNOSUPPRESSION DU SYSTEME IMMUNITAIRE

Le paradigme actuel considère la progression tumorale en regard du système immunitaire selon la théorie des « 3E » pour : élimination, équilibre et échappement ⁶⁹. Les modifications intervenant dans les cellules cancéreuses induisent l'expression de néo-antigènes, la libération de signaux de dangers et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Ces différents signaux attirent les cellules du système immunitaire inné comme adaptatif au site tumoral et conduisent à l'élimination des cellules cancéreuses ⁶⁹. Ainsi, une haute densité de lymphocytes T activés corrèle avec une meilleure survie du patient ⁷⁰.

Cependant, certaines cellules tumorales, moins immunogènes que les autres, échappent à cette éradication. Il s'ensuit une phase d'équilibre, où l'immunité adaptative est capable de maintenir une pression de sélection pour ces clones de cellules cancéreuses ⁶⁹. À terme, ces cellules peuvent proliférer et échapper au système immunitaire non seulement en profitant de leur faible immunogénicité, mais aussi par l'induction d'un microenvironnement activement immunosuppresseur ⁶⁹. Elles expriment par exemple PDL1, mais aussi des ligands capables d'inhiber la phagocytose comme CD47, ou engagent les récepteurs inhibiteurs des NK grâce à l'expression de l'antigène E du CMH-I (HLA-E) ^{7,28}. Les cellules tumorales et leur TME de support sécrètent également de nombreuses molécules solubles immunosuppressives comme du TGF- β , de l'IL-10, des catabolites du tryptophane, du PGE₂ ou du VEGF.

Cela peut conduire à une diminution progressive des cellules NK et T CD8 cytotoxiques au profit de l'apparition de T CD8 dysfonctionnels et épuisés ⁷¹, retrouvés également dans les infections chroniques, mais aussi de lymphocytes régulateurs B et T ⁶¹. De plus, les lymphocytes CD4 tendent alors vers un phénotype Th2 tandis que les DC ont une maturation défectueuse affectant leur capacité de présentation croisée ou sont exclues de la tumeur ^{57,72-74}. En parallèle, des cellules myéloïdes immunosuppressives de l'immunité innée sont recrutées et s'adaptent aux signaux du milieu, en particulier des macrophages et des neutrophiles, et forment un TME inflammatoire.

Une illustration de cette chronologie est retrouvée dans le cancer du poumon ⁷⁵. Aux stades précoces de la tumeur, l'immunité adaptative est stimulée et il y a un afflux de lymphocytes T naïfs. Lors de la progression de la lésion, les lymphocytes T et les cellules myéloïdes s'accumulent dans le TME. L'analyse transcriptomique des cellules du TME révèle une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'immunosuppression.

STRATEGIES THERAPEUTIQUES VISANT LE TME

Les différentes thérapies dirigées contre les cellules tumorales impactent et remodelent le TME ²⁸. Les modifications induites contrent ou, au contraire, soutiennent la réponse thérapeutique. Par exemple, la chimiothérapie et la radiothérapie peuvent induire une mort immunogène qui conduit à l'activation de l'immunité adaptative antitumorale. Dans d'autres contextes, ces mêmes traitements peuvent induire une inflammation qui peut contrer la réponse thérapeutique ²⁷. Ces thérapies sont limitées par de nombreux facteurs dépendant du type du cancer et des spécificités du TME inhérentes au patient ²⁸. De plus, un des mécanismes majeurs limitant leur efficacité est l'environnement immunosuppresseur des tumeurs.

Intégrer le TME dans la prise en charge thérapeutique est donc essentiel. Ainsi de nombreuses stratégies cherchent à reprogrammer ou dépléter les cellules du TME, remodeler le support matriciel et les vaisseaux ou lever l'immunosuppression ^{7,28}. Les stratégies les plus avancées aujourd'hui, approuvées ou en cours d'essai cliniques, ciblent principalement les TAM, les DC, les lymphocytes T, les vaisseaux sanguins, la matrice extracellulaire et les fibroblastes.

Pour lever l'environnement immunosuppresseur, différentes approches s'intéressent à la déplétion ou la reprogrammation des TAM ^{28,34}. Elles consistent principalement à inhiber leur recrutement au site tumoral en bloquant CCL2 ou son récepteur, à inhiber la signalisation de CD47 qui protège les cellules de la phagocytose, à augmenter leur capacité de présentation d'antigènes ou à bloquer la liaison du M-CSF avec son récepteur *colony stimulating factor 1 receptor* (CSF1-R) pour empêcher leur survie.

Pour stimuler la réponse adaptative antitumorale, un intérêt particulier est porté à la modulation de la présentation antigénique des DC ²⁸. L'administration de GM-CSF ou de FLT3L a pour but de stimuler leur survie et leur prolifération ⁷⁶⁻⁷⁸. Plus radicalement, les DC peuvent être manipulées *ex vivo* pour améliorer leur capacité de présentation d'antigènes ²⁸. L'activité antitumorale des lymphocytes T peut également être améliorée en inhibant les points de contrôles immunitaires avec des IPCI, ou par le transfert adoptif de lymphocytes T, l'utilisation de TCR ou encore de cellules *chimeric antigen receptor-T* (CAR-T).

Enfin, d'autres approches cherchent à restaurer une activité immunitaire au sein de la tumeur en mimant l'interaction avec un pathogène au site tumoral pour stimuler les voies de signalisation de l'immunité innée et adaptative ¹⁸. Ces stratégies utilisent des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) synthétiques ou bien directement des bactéries ou virus modifiés comme dans le cadre de l'immunovirothérapie oncolytique.

Ces thérapies sont étudiées dans de nombreux cancers différents. Leur utilisation nécessite une caractérisation fine de leur impact sur le TME pour ajuster et potentialiser leurs effets. Récemment, le MPM a bénéficié d'une avancée majeure dans la prise en charge des patients grâce à la modulation du TME avec des IPCI. Cependant, leur efficacité est variable d'un patient à l'autre et est fortement dépendante de la composition de l'infiltrat cellulaire du TME et des récepteurs exprimés dans les tumeurs.

LE MESOTHELIOME PLEURAL MALIN

DESCRIPTION, EPIDEMIOLOGIE ET CLASSIFICATION

Le mésothéliome pleural malin (MPM) est un cancer particulièrement agressif dû à la transformation maligne des cellules mésothéliales de la plèvre. La plèvre entoure et protège les poumons et se compose de deux feuillets. La transformation des cellules mésothéliales conduit à la formation de plaques pleurales et à l'accumulation de fluides appelée « épanchement pleural » entre ces feuillets ⁷⁹. Cela se traduit chez le patient par des douleurs thoraciques latéralisées et des dyspnées d'effort. Ces symptômes sont peu spécifiques. Ils peuvent tout aussi bien trahir la présence d'une lésion pleurale bénigne ou l'invasion de la plèvre par d'autres cancers. Après le début des symptômes, la médiane de survie est de 12 à 15 mois ⁸⁰.

En France, cette tumeur touche entre 800 et 1000 personnes chaque année ⁸⁰. Plusieurs causes sont à l'origine du MPM, mais le principal facteur de risque est une exposition à l'amiante (70% des cas; 90% chez les hommes, 50% chez les femmes). Bien que l'amiante soit interdite dans de nombreux pays occidentaux, l'incidence de ce cancer devrait continuer à augmenter. En effet, le temps de latence entre l'exposition au cancérigène et le développement de la pathologie varie de 20 à 40 ans ⁸¹. Les dernières données du programme national de surveillance du mésothéliome montrent d'ailleurs une augmentation du nombre de cas annuel, notamment chez les femmes. Le MPM reste une maladie rare qui touche principalement les individus âgés, ainsi, l'âge moyen au moment du diagnostic est de 75 ans. Il touche quatre fois plus d'hommes que de femmes, cette différence étant attribuée à des expositions professionnelles à l'amiante plus importantes dans la population masculine. D'autres facteurs étiologiques, comme une exposition aux radiations ionisantes ou des facteurs génétiques comme la perte d'expression de *BRCA1-associated protein 1* (BAP1), sont également mis en cause dans l'apparition d'un MPM.

Les manifestations cliniques peu spécifiques intervenant à un stade déjà avancé de la maladie rendent le diagnostic particulièrement tardif et difficile. De plus, le MPM est particulièrement résistant aux traitements conventionnels comme la chirurgie, la chimiothérapie ou la radiothérapie. Ces traitements ne permettent de prolonger l'espérance de vie des patients que d'un à deux ans en moyenne ^{79,81}.

Au sein du MPM, les sous-types histologiques se répartissent le long d'un spectre allant du moins agressif, le sous-type épithélioïde (70 à 80%), au plus agressif, le sous-type sarcomatoïde (10 à 20%)^{82,83}. Certains MPM appelés biphasiques (20 à 30%) peuvent combiner les caractéristiques de ces deux phénotypes extrêmes. Ces sous-types ont une valeur pronostique.

En effet, la médiane de survie après chimiothérapie est bien plus élevée pour les patients avec un MPM épithélioïde (16.5 mois) que les patients avec un sous-type sarcomatoïde (8.8 mois) ⁸⁴.

PARTICULARITES DU MESOTHELIOME PLEURAL MALIN

Il y a de très nombreuses choses à écrire sur le MPM, cependant, je ne décrirai ici que deux de ses particularités ayant un impact direct sur mon travail de thèse : d'une part les altérations génétiques des cellules tumorales mésothéliales et d'autre part l'infiltrat immunitaire du MPM.

PARTICULARITES GENETIQUES DES CELLULES TUMORALES

L'exposition à un cancérigène induit en général de très nombreuses altérations génomiques dans les cellules tumorales, cependant le MPM fait office d'exception et présente une charge mutationnelle faible ⁸⁵. Ces altérations consistent principalement en des mutations ou des altérations du nombre de copies de gènes suppresseurs de tumeurs comme *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* (*CDKN2A*), *BAP1* ou *neurofibromatose 2* (*NF2*) ⁸⁶⁻⁸⁸. Ces altérations sont utilisées pour caractériser un MPM par la méthode d'hybridation in situ en fluorescence ⁸⁹.

L'altération génétique la plus fréquente est la délétion homozygote de la région p21.3 du chromosome 9 (Figure 4)⁸⁹⁻⁹¹. La taille de cette délétion est variable, mais comprend le plus souvent le gène *CDKN2A*. Les délétions de ce gène suppresseur de tumeur se retrouvent dans 60 à 80% des patients ⁹¹. Il code plusieurs protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire notamment p14arf et p16INK4a. Leur absence permet respectivement l'entrée dans le cycle cellulaire et la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. La délétion de *CDKN2A* entraîne souvent celle de *CDKN2B* et du gène de la méthylthioadénosine phosphorylase (*MTAP*) situés juste à côté. *CDKN2B* code pour l'expression de la protéine p15Ink4b qui inhibe, elle aussi, le cycle cellulaire ⁹². Tandis que *MTAP* est impliquée dans le métabolisme de la polyamine ⁹³.

La région p21.3 du chromosome 9 comprend également un cluster de 16 gènes qui codent pour les interférons de type I : IFN-β, IFN-ε, IFN-ω et 13 IFN-α. En collaboration avec Didier Jean, du centre de recherche des Cordeliers à Paris, notre équipe a récemment montré que dans 78 lignées cellulaires à faibles nombres de passages issues de MPM, 73% d'entre elles ont une délétion homozygote du gène *CDKN2A* et 23% présentant une délétion homozygote de tous les gènes codants les IFN-I ⁹⁴. L'étude du *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) sur 82 patients donne des pourcentages plus faibles, respectivement 44% et 9%, probablement dus à la présence de cellules non malignes du TME dans les échantillons qui masque la délétion. Ainsi, près d'un patient sur cinq atteint de MPM présente une délétion homozygote des gènes IFN-I. Les conséquences de cette délétion homozygote des gènes IFN-I dans la thérapie du MPM a fait l'objet d'une revue que nous avons écrite et publiée pendant ma première année de thèse ¹¹. Dans cette revue, nous avons émis

l'hypothèse que les patients présentant des délétions homozygotes de *CDKN2A* s'étendant aux gènes IFN-I ont un microenvironnement tumoral moins favorable à l'immunothérapie. Une étude récente dans des cohortes du TCGA et du MSK-IMPACT vient étayer cette hypothèse ⁹⁵. Celle-ci montre chez des patients atteints d'adénocarcinome pulmonaire que les délétions homozygotes de *CDKN2A* et des gènes IFN-I corrélaient avec un mauvais pronostic attribué à une répression des voies de l'immunité rendant le TME immunosuppresseur.

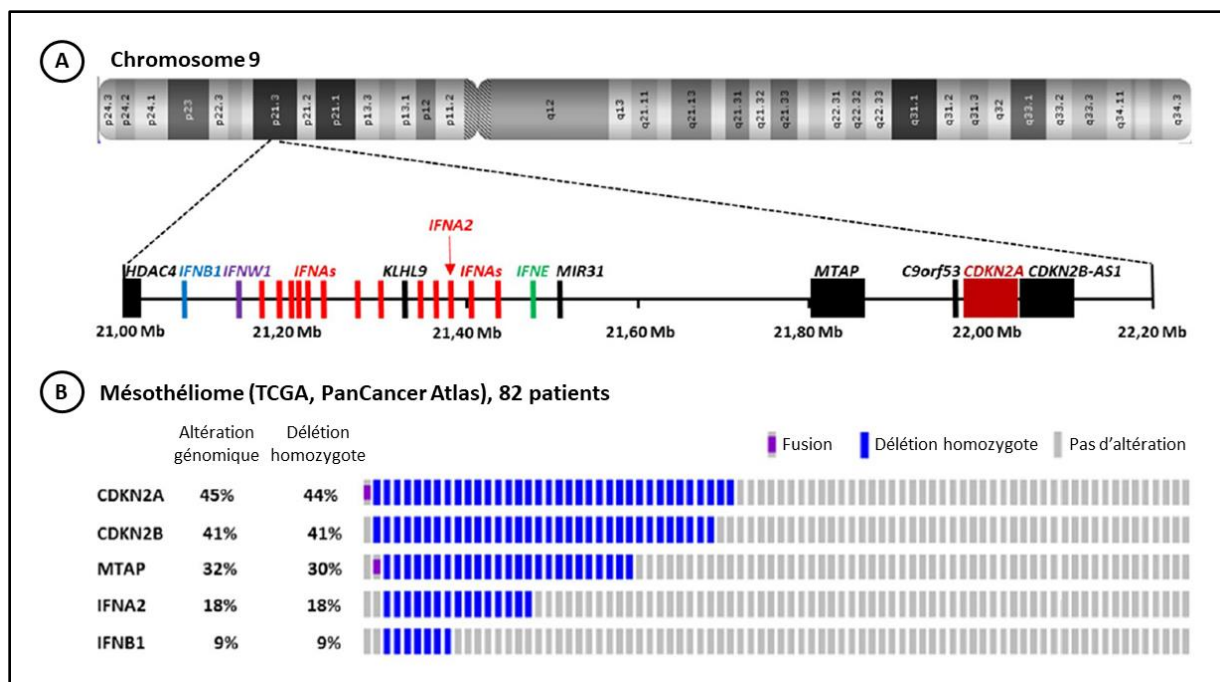


Figure 4 | Délétions homozygotes de la région p21.3 du chromosome 9 dans le MPM. (A) Représentation schématisée des gènes de la région p21.3 du chromosome 9 entre les positions 21 000 000 et 22 200 000 (B) Altérations génomiques de *CDKN2A*, *CDKN2B*, *MTAP*, *IFNA2* et *IFNB1* dans les échantillons de tumeurs de 82 patients. Seuls les patients avec au moins une altération génomique parmi les cinq gènes sont montrés. Adapté de Grard et al., Front Oncol, 2021 ¹¹.

Deux autres altérations génomiques sont abondamment décrites. Le MPM présente dans 45 à 50% des cas des altérations du gène *NF2* qui code pour la protéine merlin. Cette protéine est impliquée dans les jonctions adhérentes et sa perte favorise l'invasion tumorale ^{96,97}. La perte de *BAP1* concerne au moins 45% des MPM, principalement de type épithélioïde ^{79,96}. Ce gène code pour une enzyme de dé-ubiquitination impliquée entre autres dans la réparation de l'ADN et la transition G1/S du cycle cellulaire ⁹⁸. Cette mutation est parfois d'origine germinale ⁹⁹, elle peut alors donner lieu, en présence d'amiante, à l'accélération du développement du MPM et l'apparition de cas avant l'âge de 40 ans. Cependant, ce cas de figure est relativement rare, car les pertes d'expression de *BAP1* sont majoritairement somatiques (60%) ¹⁰⁰. Des altérations moins fréquentes touchent également d'autres gènes suppresseurs de tumeurs dans le MPM ^{83,87,96}.

COMPOSITION DE L'INFILTRAT IMMUNITAIRE

La localisation pulmonaire, véritable interface immunitaire, ainsi que l'inflammation qui résulte de la phagocytose contrariée des fibres d'amiante conditionnent le TME du MPM. Celui-ci se caractérise par une importante composante immunitaire dans les épanchements pleuraux et un infiltrat conséquent dans les tumeurs (Figure 5).

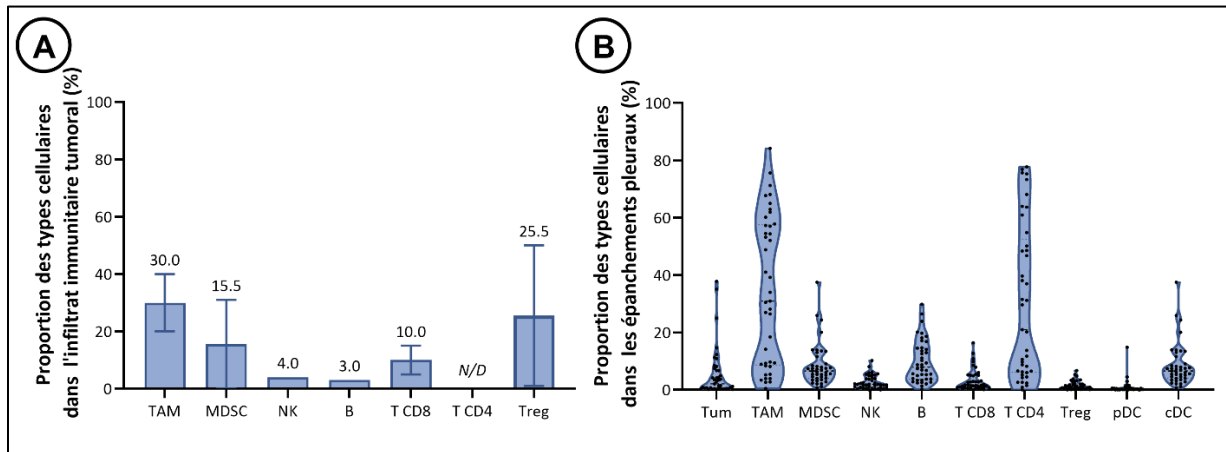


Figure 5 | Composition en cellules immunitaires du MPM. (A) Composition de l'infiltrat immunitaire dans les tumeurs d'après la littérature ¹⁰¹⁻¹⁰⁶, moyenne+/-étendue. (B) Proportion des différents types cellulaires dans les épanchements pleuraux de patients, données non publiées de l'équipe (n=42). B, lymphocytes B ; cDC, cellules dendritiques conventionnelles ; MDSC, *myeloid derived suppressive cells* ; NK, cellules *natural killer* ; pDC, cellules dendritiques plasmacytoïdes ; T, lymphocytes T ; TAM, macrophages associés aux tumeurs ; Treg, lymphocytes T CD4 Treg ; Tum, cellules tumorales.

De nombreuses études décrivent cet infiltrat immunitaire. La composition en cellules immunitaire, l'expression des récepteurs et des ligands associés à ceux-ci dépendent fortement des patients et change au cours de la progression tumorale ¹⁰¹. Néanmoins, toutes ces études révèlent un microenvironnement immunosuppresseur fort avec une prédominance de cellules myéloïdes, notamment des TAM, qui représentent 20 à 40% de l'infiltrat immunitaire tumoral (Figure 5A) ¹⁰¹⁻¹⁰³. Ces TAM sont probablement impliqués dès le début de la progression tumorale en créant un TME inflammatoire et une instabilité génétique en réponse à la présence de fibres d'amiante qu'ils sont incapables de phagocyter. On retrouve également dans le TME entre 0 et 31% de MDSC et 1 à 50% de lymphocytes Tregs ¹⁰⁴. L'infiltrat des lymphocytes T CD4 auxiliaires est très variable ¹⁰⁵, et les lymphocytes T CD8 ne représentent qu'entre 5 et 15% de l'infiltrat immunitaire ^{102,104}. En moyenne, les cellules NK composent 4% de l'infiltrat et les lymphocytes B en représentent 3% ¹⁰². Ces derniers sont infiltrés dans 50% des échantillons de patients ¹⁰⁶ et leur présence est associée à un meilleur pronostic ^{62,64}. Les différentes fonctions adoptées par ces cellules sont abordées dans la partie dédiée au microenvironnement tumoral.

Des données non publiées de l'équipe dans laquelle j'ai réalisé ma thèse révèlent que les cellules retrouvées dans les épanchements pleuraux associés au MPM sont essentiellement immunitaires, avec une prédominance de cellules myéloïdes et de lymphocytes T CD4 (Figure 5B). Ces observations recoupent celles de la littérature où les épanchements pleuraux sont composés de lymphocytes T CD4 mémoires, mais avec peu de recrutement de lymphocytes T CD8 ou de cellules NK ¹⁰⁷. Dans les tumeurs, une infiltration importante de lymphocytes T CD8 est souvent associée à une expression forte de PDL1 par les cellules du TME et une faible réponse à la chimiothérapie ¹⁰⁸. Cela en fait des cibles d'intérêt pour l'immunothérapie avec des anticorps dirigés contre les points de contrôle immunitaire. À l'inverse, une faible infiltration est souvent de meilleur pronostic, suggérant que les fonctions cytotoxiques des lymphocytes T peuvent encore être effectives. Dans le MPM, la répression des fonctions cytotoxiques des lymphocytes T est associée à une présence importante de CD4 Treg et à l'expression de *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domain* (TIGIT) ¹⁰². En revanche, la présence de cellules T mémoires et l'expression de TIM3 sur les lymphocytes T CD8 sont plutôt associés à une production de cytokines et suggère un maintien de l'activité cytotoxique.

L'hypoxie du TME et le contenu inflammatoire de l'épanchement pleural attirent les monocytes au site tumoral ^{18,19}. Dans le MPM, la principale cytokine impliquée dans le recrutement des monocytes est CCL2 et attire en majorité des monocytes au phénotype classique. De plus, la concentration de CCL2 augmente avec le stade de la tumeur ^{19,109}. Dans le MPM, un taux élevé de monocytes circulants est associé à un mauvais pronostic ¹¹⁰.

Les TAM du MPM proviennent essentiellement de ces monocytes. Leur polarisation est principalement dirigée par la présence de M-CSF dans le TME ¹¹¹, sécrété en partie par les cellules tumorales ¹⁹. Les travaux du laboratoire dans lequel j'ai effectué ma thèse ont montré qu'ils expriment fortement CD163 et sécrètent de l'IL-10 au contact des cellules tumorales. Cela suggère qu'ils acquièrent un phénotype de type M2 soutenant l'inflammation locale et la prolifération tumorale et facilitent la transition épithélio-mésenchymateuse ¹⁹. En outre, ces TAM expriment souvent PDL1 et sécrètent de nombreuses cytokines, dont l'IL-10, qui en font des suppresseurs de lymphocytes T cytotoxiques ^{19,102,111,112}. Leur présence est souvent associée à une mauvaise survie et une résistance aux traitements ^{64,113}. D'autre part, les macrophages résidant dans les tissus acquièrent un phénotype immunosuppresseur, contribuant entre autres à l'épuisement de la population lymphocytaire par une activation constante de la réponse IFN- γ ¹¹⁴.

TRAITEMENTS

Le MPM est généralement incurable. À titre d'exemple, entre 2004 et 2014 aux États-Unis, seuls 2,5% des patients ayant un MPM ont survécu et ils présentaient tous un stade précoce et

localisé de la maladie ¹¹⁵. Pour la plupart des patients, le diagnostic intervient cependant à un stade plus avancé et moins bien localisé de la tumeur.

Les recommandations de traitement de première ligne du MPM reposent sur l'utilisation de la chimiothérapie et de l'immunothérapie. La chimiothérapie consiste en une combinaison d'un sel de platine, le cisplatine, et d'un anti-métabolite, le pemetrexed ¹¹⁶. L'ajout d'un anti-VEGF, le bevacizumab, à cette chimiothérapie permet d'augmenter significativement la survie des patients de moins de 75 ans qui y sont éligibles. Récemment, l'essai Checkmate743 a comparé l'association d'un anti-PD1, le nivolumab, et d'un anti-CTLA4, l'ipilimumab, à la chimiothérapie de première ligne ⁸⁴ et a montré une augmentation de la médiane de survie globale de 14,1 mois à 18,1 mois. Cet effet est particulièrement marqué dans les sous-groupes non épithélioïdes où l'on retrouve 41% des patients survivants deux ans après traitement par immunothérapie contre 27% pour ceux traités par chimiothérapie. Cela a conduit à l'adoption de l'immunothérapie en première intention dans le MPM non épithélioïde. Cette combinaison peut aussi être utilisée pour les MPM de types épithélioïdes dès la première ligne ⁸⁰.

Les recommandations de deuxième ligne incluent la chimiothérapie, mais aussi l'immunothérapie en monothérapie ou en association ⁸⁰.

Enfin, les interventions chirurgicales concernent seulement un à deux pour cent des patients ⁸⁰. Dans la plupart des cas, la chirurgie est partielle et vise à réduire la taille de la tumeur. Cela permet une meilleure accessibilité aux traitements adjuvants de routine ou en essai clinique. Parfois la chirurgie est plus lourde et consiste en l'exérèse de la plèvre pariétale, mais aussi d'une partie des organes adjacents comme le poumon, le péricarde et le diaphragme. Celle-ci est réalisée moins fréquemment en raison de sa morbidité-mortalité importante, et concerne uniquement les MPM épithélioïdes. Elle a l'avantage de permettre l'utilisation de la radiothérapie pour diminuer le risque de rechute. Dans le cadre du MPM, la radiothérapie peut également être utilisée dans un but palliatif pour ses effets antalgiques ou sur les points de ponctions du drain du liquide pleural pour y éviter la formation de nouvelles tumeurs.

Les traitements avec des IPCI ont montré une nette amélioration dans la prise en charge des patients. Cependant, les paramètres biologiques qui influencent la réussite de ces thérapies dépendent fortement de l'infiltrat immunitaire du MPM et de l'expression de PDL1 chez les patients. Pour soutenir l'effet des IPCI, certaines approches cherchent donc à augmenter l'expression de PDL1 dans le TME. D'autres stratégies cherchent quant à elles à induire une mort immunogène dans le TME pour attirer des cellules de l'immunité et restaurer une réponse immunitaire dirigée contre la tumeur en utilisant par exemple des virus oncolytiques.

L'IMMUNOTHERAPIE ONCOLYTIQUE

LES VIRUS ET LE CANCER

Les virus oncolytiques (OV) sont des virus réplicatifs qui ciblent spécifiquement les cellules tumorales tout en épargnant les cellules saines (Figure 6) ¹¹⁷. En se répliquant dans les cellules cancéreuses, ils provoquent leur mort immunogène qui permet le recrutement et l'activation du système immunitaire au site tumoral. De plus, ils peuvent être modifiés pour produire une protéine thérapeutique dans le TME.

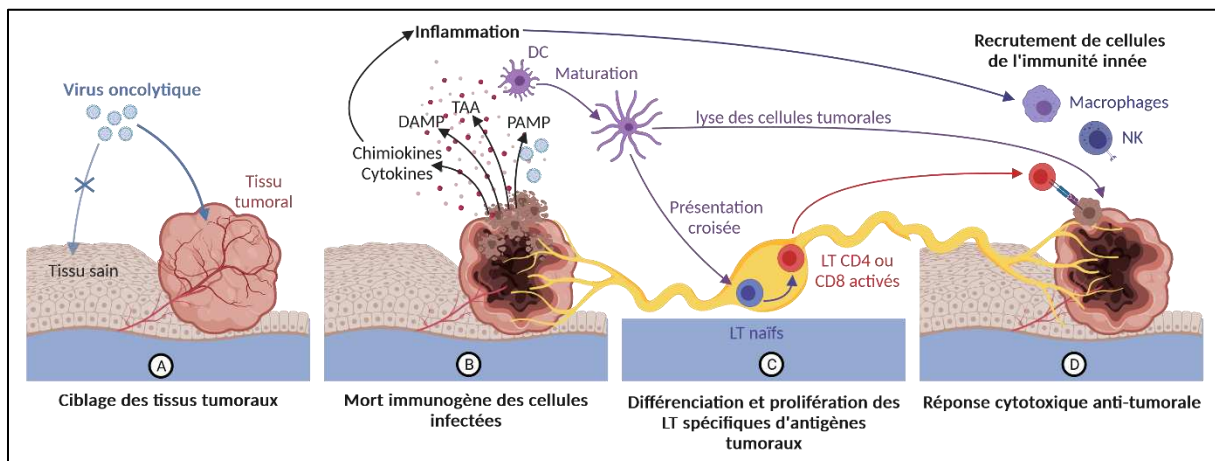


Figure 6 | Mécanisme d'action des virus oncolytiques. (A) Les virus oncolytiques se répliquent sélectivement dans les cellules tumorales et (B) induisent leur mort immunogène. L'inflammation qui en découle permet le recrutement de cellules de l'immunité innée et la maturation de cellules dendritiques (DC). (C) Les DC présentent des antigènes tumoraux aux lymphocytes T (LT). (D) Les LT migrent et exercent alors une action cytotoxique dirigée contre les cellules tumorales. Adapté de Petithomme *et al.*, Med Sci (Paris) 2020 ¹¹⁸. DAMP, motifs moléculaires associés aux dangers ; NK, cellules *natural killer* ; PAMP, motifs moléculaires associés aux pathogènes ; TAA, antigènes associés aux tumeurs.

L'utilisation de virus pour traiter les cancers fait suite à l'observation de cas de rémission spontanée et de régressions partielles des tumeurs chez des patients à la suite d'infections virales ¹¹⁹⁻¹²¹. La caractérisation des virus et de leurs propriétés lytiques conduit dans les années 1950-1960 à essayer plusieurs virus atténués pour traiter différents cancers, mais sans véritable succès. Ce n'est qu'avec les progrès de la biologie moléculaire que l'immunothérapie oncolytique prend réellement son essor permettant la commercialisation de plusieurs virus oncolytiques depuis 20 ans. Actuellement, trois virus sont sur le marché et un peu plus d'une centaine d'essais cliniques sont en cours pour évaluer l'efficacité oncolytique de virus seuls ou en association à d'autres thérapies ¹¹⁷. Ces essais ont des cibles très variées allant des cancers hématologiques aux cancers solides. En outre, de nombreux virus différents, et souvent modifiés, sont étudiés permettant ainsi

de jouer sur une gamme étendue de propriétés intéressantes afin de freiner la propagation tumorale.

Outre la lyse des cellules tumorales, l'intérêt des OV réside dans leur capacité à transformer un TME à la composante immunitaire tolérogène appelée « froide » en un TME « chaud » dont la composante immunitaire exerce une action cytotoxique contre les cellules présentant des antigènes viraux, mais aussi tumoraux ^{122,123}.

REPLICATION SPECIFIQUE DES VIRUS ONCOLYTIQUES DANS LES CELLULES TUMORALES

Les OV sont sélectionnés ou modifiés pour lyser exclusivement les cellules tumorales ¹²⁴. Ils ciblent et se répliquent précisément dans les cellules tumorales soit en interagissant avec des récepteurs spécifiques propres à ces dernières, soit en profitant des propriétés caractéristiques des cellules tumorales pour s'y répliquer (Figure 7).

Certains OV possèdent un tropisme spontané pour les cellules tumorales qui surexpriment leurs récepteurs d'entrée. C'est le cas du virus de la rougeole (*Measles virus*, MV) dont les souches vaccinales utilisent le récepteur CD46 pour l'entrée dans la cellule ¹²⁵⁻¹²⁷. CD46 est souvent surexprimé par les cellules cancéreuses, car il protège celles-ci contre l'action du complément. Les protéines d'enveloppes ou de capsid virale peuvent également être modifiées pour cibler des protéines spécifiques des cellules tumorales ^{128,129}.

Après son entrée dans la cellule, le virus profite des nombreux processus altérés dans les cellules tumorales pour favoriser sa réplication ¹²⁴. Ainsi, l'immortalité répllicative, la production de signaux de prolifération ainsi que l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, favorisent la réplication de nombreux virus à ADN ayant lieu en condition normale dans les cellules en division. Certains virus comme celui de la vaccine sont ainsi délétés des gènes viraux codant la thymidine kinase ou la ribonucléotide réductase pour dépendre de l'expression du gène cellulaire équivalent afin d'assurer la synthèse de leur génome ¹³⁰. D'autres virus sont modifiés pour exprimer des gènes essentiels à leur cycle réplcatif sous le contrôle d'un promoteur suractivé ¹³¹ ou de microARN sous exprimés dans les cellules tumorales ¹³². Ainsi la réplication de plusieurs adénovirus oncolytiques dépend de la disponibilité du facteur de transcription E2F ¹³³⁻¹³⁶. Ce facteur est normalement inhibé par l'expression de la protéine Rb dont le gène suppresseur de tumeur est neutralisé dans de nombreux cancers. De même, l'activité de traduction augmentée de la cellule tumorale offre un contexte favorable à la production de nouveaux virions. Par exemple, la stimulation de la traduction cellulaire avec l'*insulin-like growth factor-1* (IGF-1) ou la surexpression d'*eukaryotic translation initiation factor 4E* (eIF4E) améliore l'activité oncolytique du MV ¹³⁷.

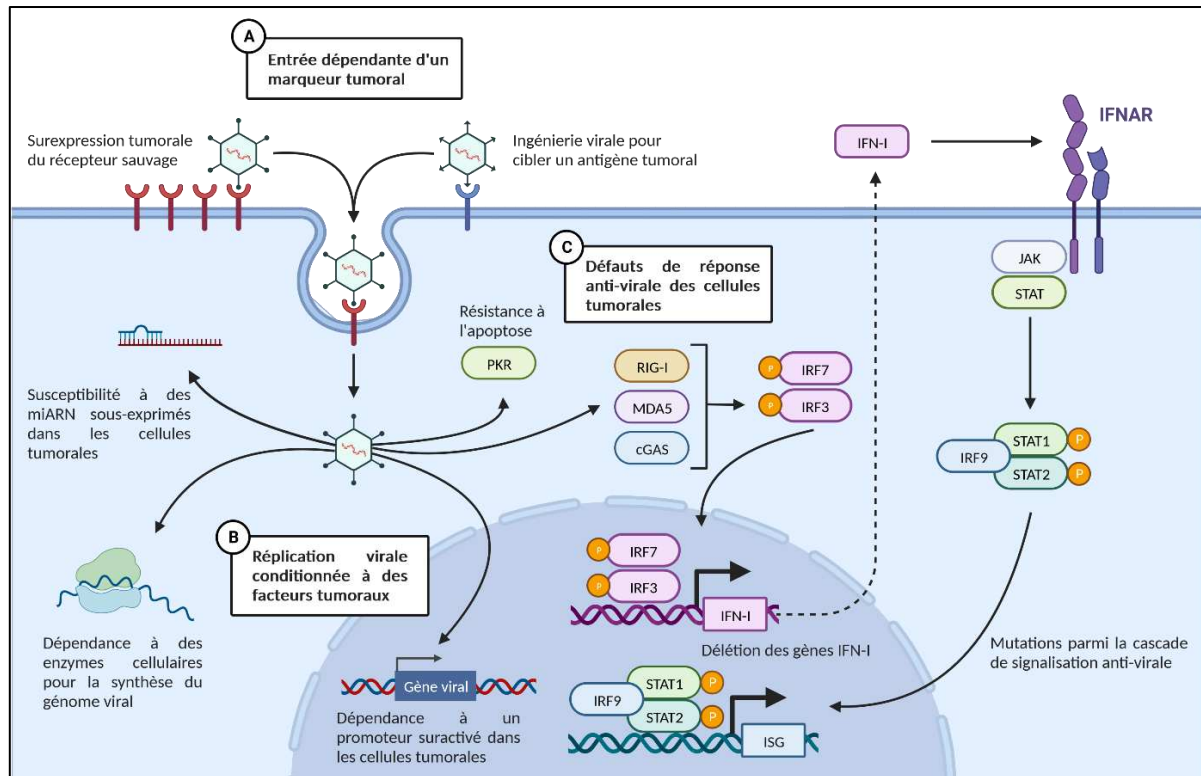


Figure 7 | Déterminants du tropisme des virus oncolytique pour les cellules tumorales. La réplication préférentielle des virus oncolytiques dans les cellules tumorales peut s'expliquer par (A) une entrée virale facilitée par la surexpression d'un récepteur par les cellules tumorales, (B) une dépendance de la réplication virale à certaines caractéristiques tumorales, telles que des microARN (miARN) ou des promoteurs dérégulés ou (C) des défauts de réponse antivirale. Adapté de la thèse d'Ugo Hirigoyen, 2023. cGAS, *cyclic GMP AMP synthase* ; IFN, interféron ; IFNAR, *interferon alpha/beta receptor* ; IRF, *interferon regulatory factor* ; ISG, *interferon stimulated genes* ; JAK, *Janus kinase* ; MDA5, *melanoma differentiation associated protein 5* ; RIG I, *retinoic acid inducible gene 1* ; PKR, *protéine kinase R* ; STAT, *signal transducer and activator of transcription*.

La résistance à la mort cellulaire acquise par les cellules tumorales permet la réplication de virus dont la multiplication est normalement limitée par l'apoptose. Pour jouer sur cette propriété, la protéine *E1B55K*, qui interagit normalement avec p53 pour bloquer l'apoptose, a été délétée dans l'adénovirus H101 afin d'empêcher leur réplication dans les cellules saines sans la limiter dans les cellules tumorales ¹³⁸. Cette résistance à l'apoptose peut cependant affecter l'activité oncolytique de certains OV, comme le MV, pour lequel l'implication de la caspase 3 ¹³⁹ et dont l'efficacité oncolytique est diminuée dans les lymphomes de cellules B surexprimant la protéine anti-apoptotique Bcl-2 ¹⁴⁰.

Afin d'échapper au système immunitaire, les cellules cancéreuses ont souvent des voies de défense antivirale altérées, en particulier la réponse IFN-I ¹⁴¹. Certaines stratégies reposent sur la neutralisation de facteurs de virulence qui bloquent la réponse IFN-I afin de limiter la réplication

virale dans les cellules saines qui ont une réponse IFN-I fonctionnelle, mais pas les cellules tumorales, où elle est défaillante. C'est le cas des souches atténuées du MV ¹⁴² ou du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) ¹⁴³. Enfin, l'échappement au système immunitaire des cellules tumorales grâce à l'immunoediting permet au virus de se répliquer dans un environnement immunosuppresseur favorable.

LA REPONSE INTERFERON DE TYPE I

La voie IFN-I a un rôle clé dans l'établissement d'une réponse immunitaire antivirale et l'élimination des pathogènes (Figure 8)¹⁴⁴. En quelques heures seulement, ce système limite l'infection et contient le pathogène en activant différentes voies de transduction qui aboutissent à la production de cytokines et de chimiokines par la cellule infectée, dont de l'IFN- β et des IFN- α . En plus d'alerter le système immunitaire, à travers le recrutement et l'activation de cellules de l'immunité innée et adaptative, ces cytokines provoquent, dans la cellule infectée et les cellules voisines, l'expression de nombreux gènes stimulés par les IFN-I (*Interferon Stimulated Genes*, ISG) dont beaucoup présentent une activité antivirale.

L'attachement et l'entrée du virus dans la cellule permettent la reconnaissance de PAMP viraux par les PRR ¹⁴⁵. Ceux-ci sont composés de plusieurs familles de récepteurs, dont les *toll-like receptors* (TLR), *RIG-I-like receptors* (RLR) et *AIM2-like receptors* (ALR). Ils sont situés au niveau des membranes et des compartiments endolysosomiaux ou bien directement dans le cytosol où ils reconnaissent de l'ADN, des extrémités triphosphates l'ARN ou de l'ARN sous forme double brin. Les récepteurs capables de signaler l'infection sont très variables d'un type cellulaire à l'autre et leur diversité permet d'induire une réponse antivirale adaptée aux fonctions de la cellule infectée. Ainsi, lors d'une infection par le MV, toutes les cellules nucléées reconnaissent le matériel génétique du virus grâce aux RLR ¹⁴⁶⁻¹⁵⁰. Les cellules immunitaires innées comme les DC reconnaissent en plus la protéine H virale grâce au récepteur TLR2 ^{151,152} et les pDC reconnaissent l'ARN simple brin viral dans le compartiment endolysosomal grâce à leur forte expression de TLR7 ⁵².

Ainsi, dans les cellules non immunitaires, les récepteurs les plus indiqués pour l'induction d'IFN-I en réponse au virus sont ceux capables de reconnaître le matériel génétique viral ^{144,145}. L'ARN viral est reconnu par les RLR, incluant *Retinoic acid inducible gene 1* (RIG-I, aussi appelé DDX58) qui reconnaît l'ARN simple brin exogène tandis que *melanoma differentiation associated gene 5* (MDA-5) et *laboratory of Genetics and Physiology 2* (LGP-2) reconnaissent l'ARN double brin. Les virus à ADN sont reconnus par les ALR et la *cyclic GMP-AMP (cGAMP) synthase* (cGAS). La reconnaissance des ARN et ADN viraux déclenche respectivement l'activation des voies *Mitochondrial Antiviral Signaling protein* (MAVS) et *stimulator of IFN genes* (STING). Ces protéines

recrutent des kinases activant les facteurs de transcription IRF3 et NFκB, déclenchant la production d'IFN-β et de cytokines inflammatoires permettent d'attirer les cellules immunitaires.

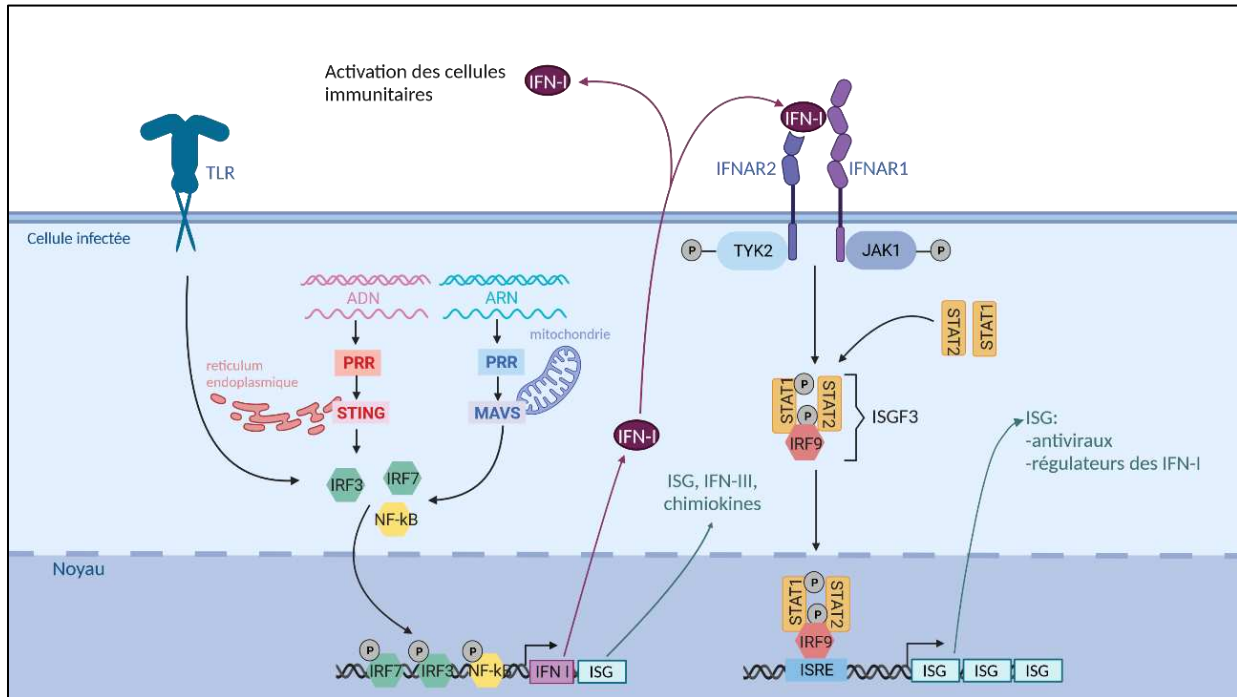


Figure 8| La réponse IFN-I. L'ADN ou l'ARN viral sont reconnus par les PRR qui activent la signalisation STING ou MAVS. Ces signalisations induisent la translocation nucléaire des facteurs de transcription IRF3 et NFκB qui permettent l'expression d'IFN-β ainsi que de quelques gènes stimulés par les IFN-I (ISG). IRF7 est activé dans un second temps et permet l'expression d'IFN-α. L'IFN-I est sécrété et se fixe sur IFNAR qui conduit à la formation du complexe ISGF3 pour induire l'expression d'un panel d'ISG antiviraux accompagnés de régulateurs négatifs et positifs de la réponse IFN-I. Adapté de Grard et al., Front Oncol, 2021 ¹¹. IFN, interferon; IFNAR, *interferon alpha/beta receptor*; IRF, *interferon regulatory factor*; ISG, *interferon stimulated genes*; ISRE, *interferon stimulated response element*; JAK, Janus kinase; MAVS, *mitochondrial antiviral signaling protein*; PRR, *pathogen recognition receptor*; STAT, *signal transducer and activator of transcription*; STING, *stimulator of interferon genes*; TYK, tyrosine kinase.

Les IFN-I sont la plus grande famille d'interférons, ils sont composés de divers sous-types majoritairement représentés par les IFN-α et l'IFN-β ¹⁴⁴. Les IFN-α sont codés par 13 gènes donnant 13 isoformes dont la plus active chez l'homme est l'IFN-α2. L'IFN-β est codé par le gène *IFNB1*. Les IFN-I sont exprimés par toutes les cellules et notamment par les pDC, capables d'en produire des quantités très élevées ⁵⁰. Dans la majorité des cellules, la production d'IFN-I s'effectue en deux temps. Dans un premier temps, la reconnaissance du virus induit la dimérisation du facteur de transcription IRF3 puis la translocation nucléaire de ce dimère ainsi que de NFκB, permettant leur fixation sur le promoteur du gène *IFNB1*. L'expression de l'IFN-β permet alors l'expression de

nombreux autres ISG dont le gène codant pour le facteur de transcription IRF7¹⁵³. Son expression permet son recrutement en tant que facteur de transcription avec IRF3 et NFκB permettant une boucle d'amplification de la réponse antivirale. Cela conduit, dans un second temps, à la production simultanée d'IFN-α et d'IFN-β. Les pDC expriment constitutivement IRF7 ce qui leur permet de produire très tôt et simultanément l'IFN-β et les IFN-α⁵⁰.

Une fois produits, les IFN-I sont sécrétés par la cellule infectée et se fixent sur leur récepteur *Interferon-alpha/beta receptor* (IFNAR)^{144,145}. Il s'agit d'un dimère composé des sous-unités IFNAR1 et IFNAR2 qui est présent sur toutes les cellules de l'organisme. Les IFN-I interagissent donc non seulement sur les récepteurs de la cellule infectée, mais aussi sur ceux des cellules adjacentes. La fixation de l'IFN-I permet la dimérisation d'IFNAR et rapproche ainsi la *tyrosine kinase 2* (TYK2) de la *Janus kinase 1* (JAK1). Ce mécanisme permet le recrutement de STAT2 qui forme alors un hétérodimère avec STAT1, afin d'entrer dans le noyau. Ils s'associent avec le facteur de transcription IRF9 et forment ainsi le complexe *Interferon-stimulated gene factor 3* (ISGF3) qui permet la transcription de plusieurs centaines d'ISG.

L'expression des ISG au terme de cette cascade de signalisation permet de mettre la cellule dans un état antiviral¹⁴⁴. Les protéines codées par les ISG agissent sur le virus lui-même en bloquant son entrée, sa transcription, sa traduction, sa réplication, son assemblage ou son bourgeonnement. De nombreux ISG n'ont pas d'activités antivirales directes et sont des acteurs ou des modulateurs de la réponse IFN-I. D'autres ISG vont promouvoir l'apoptose cellulaire. Certains ISG sont activables comme la Protéine Kinase R (PKR). Elle s'active après la reconnaissance des structures d'ARN doubles brins et des éléments viraux. La PKR bloque alors les synthèses protéiques de la cellule et déclencher rapidement sa mort.

Deux autres réponses interféron existent. La réponse interféron de type III fait intervenir les IFN-λ1/2/3/4¹⁵⁴. L'expression du récepteur aux IFN-III est restreinte aux cellules épithéliales et à certaines cellules immunitaires comme les neutrophiles. Ils déclenchent une réponse antivirale plus modérée et moins inflammatoire que la réponse IFN-I. La réponse interféron de type II est représentée par l'IFN-γ qui est principalement sécrété par les lymphocytes T et les cellules NK¹⁵⁵. L'IFN-γ augmente les capacités de présentation d'antigènes des cellules cibles des lymphocytes T et des cellules NK, en augmentant leurs voies d'apprêtement d'antigènes, les molécules d'adhésion en surface et l'expression des molécules du CMH.

LA REPONSE INTERFERON DE TYPE I DANS LE CANCER

Dans les cellules tumorales, la réponse IFN-I peut s'activer en l'absence d'infection par un pathogène. En effet, la tumorigenèse bouleverse de nombreux mécanismes de régulation épigénétique et peut par exemple lever la répression transcriptionnelle des régions où se sont

intégrés des rétrovirus endogènes ¹⁵⁶. Cette déméthylation autorise l'expression de rétrovirus sous la forme d'ARN double brin dans le cytoplasme capable d'activer à la fois la signalisation MAVS et la PKR qui déclenchent la mort rapide de la cellule tumorale. Ainsi dans les cellules de MPM, la reconnaissance de ces rétrovirus endogènes et l'induction des ISG sont associées à une meilleure survie pour le patient ¹⁵⁷. De plus, l'instabilité chromosomique et la formation de micronoyaux peut conduire à la détection d'ADN nucléaire et mitochondrial par cGAS dans le cytoplasme de la cellule tumorale et l'activation de la réponse IFN-I par la voie STING ¹⁵⁸. Cette même voie permet aussi de déclencher la réponse IFN-I dans les cellules de l'immunité innée phagocytant les cellules tumorales nécrosées ¹⁵⁹.

La réponse IFN-I a une action immunostimulatrice, antiproliférative, anti-angiogénique et pro-apoptotique forte qui freine le développement d'une tumeur ¹⁴¹. L'échappement immunitaire et l'oncogenèse conduisent donc souvent à la sélection de clones tumoraux ayant des défauts de la réponse IFN-I. Ainsi, les altérations de cette voie favorisent la transformation maligne, la formation de tumeurs et l'apparition de métastases chez des souris ¹⁶⁰⁻¹⁶³. Ces défauts se retrouvent dans la reconnaissance d'acides nucléiques viraux, dans les voies de transduction du signal, ainsi que dans la production d'ISG.

On retrouve dans de nombreux cancers, dont le MPM, une délétion homozygote de la partie p21 du chromosome 9 codant pour CDKN2A et les gènes codant les IFN-I ^{94,164-166}. Récemment, il a été montré que les délétions de *CDKN2A/B* et des gènes IFN-I conduisent à un mauvais pronostic en supprimant la réponse immunitaire dans l'adénocarcinome du poumon ⁹⁵. Enfin, dans un modèle de cancer pancréatique murin, l'utilisation de la technique *molecular alteration of chromosomes with engineered tandem elements* (MACHETE) qui permet de faire des délétions homozygotes de longueurs variables dans le génome, a mis en évidence que la perte des gènes codant les IFN-I provoque l'échappement immunitaire des cellules tumorales et favorise l'apparition de métastases ¹⁶⁷.

D'autres défauts des acteurs de la voie IFN-I ont été mis en évidence comme la perte d'expression de STING ^{168,169}, la mutation ou la sous-expression de STAT1 ¹⁷⁰, la perte d'IRF9 ¹⁷¹ ou l'épissage alternatif d'IRF3 ¹⁷². En outre, l'expression de certains oncogènes comme *KRAS*, *MYC* ou *HER2* sont capables de réguler négativement l'expression de la réponse IFN-I ^{173,174}. Il existe donc lors du développement tumoral une pression qui tend à inactiver la réponse IFN-I de différentes façons.

Les virus oncolytiques profitent de ces défauts pour se répliquer dans les cellules tumorales. Ainsi la sensibilité du MPM à la souche vaccinale du MV ou au VSV s'explique par les défauts de la réponse IFN-I ^{142,175}.

LA MORT IMMUNOGENE INDUITE PAR LES OV

La réplication virale dans les cellules cancéreuses exerce un effet oncolytique direct en entraînant la mort des cellules tumorales et s'accompagne d'une désorganisation du TME ^{122,124}. Cette lyse est particulièrement immunogène et induit une réponse immunitaire systémique dirigée contre le virus, mais aussi contre la tumeur.

INDUCTION DE LA REPONSE IMMUNITAIRE INNEE

La mort cellulaire immunogène des cellules infectées permet le recrutement massif et l'activation des cellules immunitaires innées telles que les monocytes, les neutrophiles, les macrophages, les NK et les DC (Figure 9)¹²². Elle se caractérise par l'expression et la libération de DAMP. Parmi eux, le relargage d'ATP permet le recrutement de DC. L'exposition de calréticuline à la surface des cellules tumorales infectées agit comme un signal de phagocytose pour les macrophages et les DC. La sécrétion de cytokines comme le TNF- α ou les IFN-I, et la libération d'HMGB1 activent la maturation des DC ¹²². De nombreux PAMP sont également libérés et sont alors reconnus par les PRR des cellules de l'immunité innée, contribuant à leur activation ¹⁷⁶. Enfin, des TAA sont libérés et capturés par les DC qu'elles utilisent ensuite pour activer la réponse immunitaire adaptative. Les cellules infectées surexpriment aussi des ligands activateurs de NK qui exercent alors leur effet cytotoxique via *TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand* (TRAIL), le relargage de perforine et de granzyme et l'engagement de leur récepteur NKp30/44.

De plus, la mort cellulaire immunogène permet la libération de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines par les cellules tumorales et celles de leur TME ¹⁷⁷. La présence de signaux de dangers issus de la réplication virale conduit notamment à la sécrétion d'IFN-I qui soutient l'établissement de la réponse immunitaire innée ^{141,178}. Ils permettent le recrutement de neutrophiles, de DC et de macrophages qui produisent à leur tour des cytokines inflammatoires, dont de l'IFN-I (ainsi que de l'IL-12 pour les DC et les neutrophiles et de l'IL-1 β , du TNF- α et de l'IL-18 par les macrophages), qui favorisent le recrutement d'autres cellules de l'immunité innée. Sous l'influence de signaux comme l'IFN-I, l'IFN- γ , l'IL-12 et l'intégrine CCR1/B1, les neutrophiles et les macrophages exercent une action cytotoxique à la fois antitumorale et antivirale en exprimant TRAIL et des métabolites toxiques tels que les ROS. Ils soutiennent également l'activation des lymphocytes T en présentant des antigènes. Leur production d'IFN-I permet d'améliorer la survie des lymphocytes T tout en limitant l'activité des Treg.

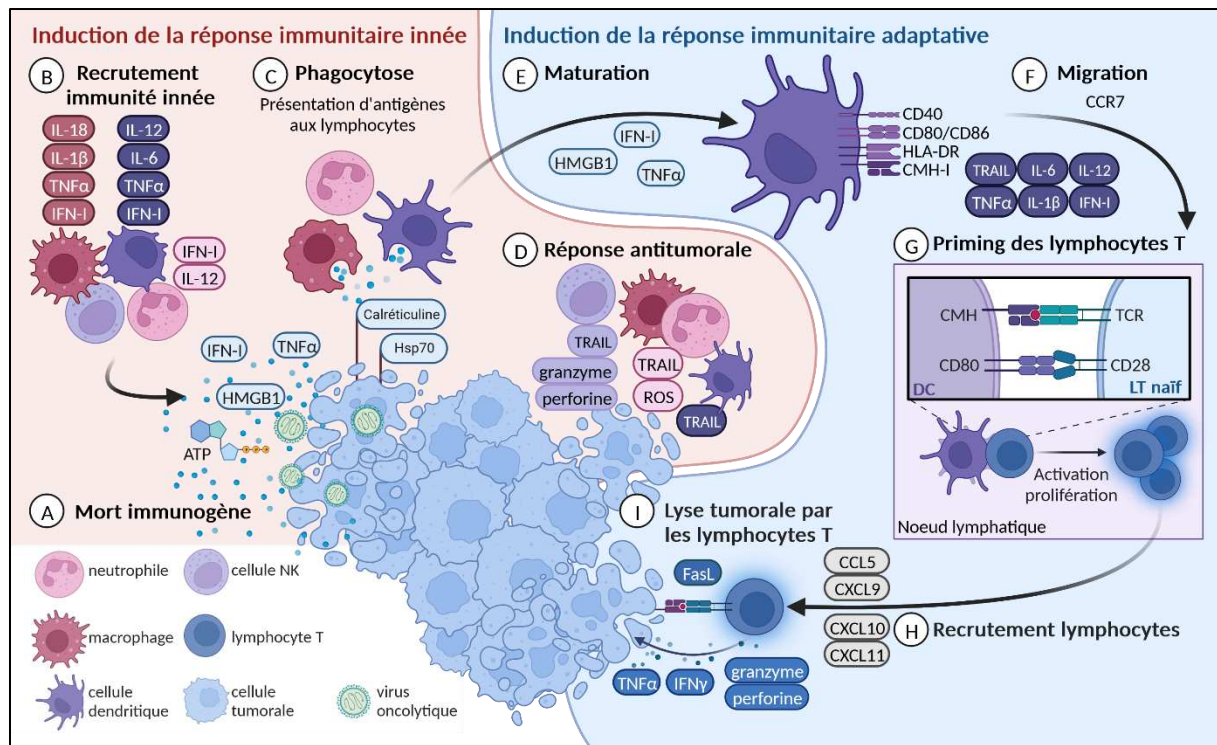


Figure 9 | Activation de la réponse immunitaire dirigée contre les cellules cancéreuses par les virus oncolytiques. (A) La mort immunogène des cellules tumorales induite par la réplication virale (B) recrute de cellules de l'immunité innée et permet la sécrétion de nombreuses cytokines attirant de nouveaux effecteurs immunitaires. (C) L'expression de DAMP comme la calréticuline à la surface des cellules tumorales permet leur phagocytose par les cellules de l'immunité innée. Ces cellules présenteront les antigènes de tumeurs aux lymphocytes T (LT) et (D) exercent une réponse antitumorale. (E) Les cytokines libérées par la lyse tumorale permettent la maturation des cellules dendritiques (DC). (F) Les DC migrent dans les nœuds lymphatiques (G) où elles réalisent le *priming* des lymphocytes T (LT). (H) Les LT migrent jusqu'au site tumoral où (I) ils exercent leur action cytotoxique. ATP, Adénosine triphosphate ; CCR7, *C-C motif chemokine receptor 7* ; CMH, complexe majeur d'histocompatibilité (*HLA*) ; FasL, *Fas ligand* ; HMGB1, *high mobility group protein B1* ; Hsp70, *heat shock protein 70* ; IFN, interféron ; IL, interleukine ; ROS, espèce réactive de l'oxygène ; TNF, *tumor necrosis factor* ; TRAIL, *TNF-related apoptosis inducing ligand*.

Les IFN-I permettent, en outre, la maturation des DC et favorisent leur migration jusqu'aux ganglions lymphatiques ¹⁴¹. Ils améliorent également la cytotoxicité des NK et des lymphocytes CD8 en augmentant l'expression de perforine et de granzyme B. De plus, leur présence dans le TME favorise l'expression de CMH-I par les cellules et accentue ainsi la réponse adaptative contre la tumeur. Cependant, la sécrétion d'IFN-I met également en place de nombreux mécanismes de rétrocontrôle immunitaire et induit notamment l'expression de PDL1 qui peut limiter l'activité antitumorale de l'immunité adaptative ¹⁷⁹.

Ainsi, lors de la lyse des cellules tumorales infectées par des réovirus, celles-ci libèrent de l'ARN double brin typique de ce génome viral ¹⁸⁰. Leur reconnaissance par la PKR des DC induit leur maturation et le relargage de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (IFN- α , IL-12, TNF- α et IL-6). L'infection avec le virus de la rougeole (MV) active, quant à elle, les RLR et TLR des DC ^{52,146}. Elles sécrètent alors de l'IFN- α , ce qui leur permet d'acquérir des fonctions cytotoxiques à travers l'expression de TRAIL.

INITIATION DE LA REPONSE IMMUNITAIRE ADAPTATIVE

Une fois au site tumoral, les DC phagocytent les cellules infectées et capturent les TAA ^{122,178}. Leur maturation induit une diminution de leur activité phagocytaire et une augmentation de leur capacité d'apprêtement et de présentation des antigènes. Elles surexpriment en outre des marqueurs d'activation comme CD83, de molécules d'adhésion comme CD54 (ICAM-1) ou CD58 (LFA-3) et des récepteurs de costimulation tels que CD80 et CD86. De plus, elles perdent l'expression de leurs récepteurs de recrutement tumoral en faveur de récepteurs chimiokines spécifiques des organes lymphoïdes secondaires, tel que CCR7. Elles migrent alors dans ces organes, vers la source de CCL19 et CCL21, pour y présenter les antigènes du TME aux lymphocytes T et B. Ainsi, la mort immunogène induite par la réplication du MV induit la maturation des DC et la présentation croisée des antigènes associés aux tumeurs aux lymphocytes T CD8⁺ naïfs ^{52,181,182}. Ce mécanisme est également observé lors de la mort immunogène induite par d'autres virus comme les parvovirus ou réovirus ^{180,183}.

Le contexte cytokinique et la présentation d'antigènes par les DC activent les lymphocytes T CD4 et CD8 qui migrent vers le site tumoral grâce à la présence de CXCL9, CXCL10 et CXCL11 ¹²³. Ceux-ci exercent une activité cytotoxique contre les cellules tumorales exprimant les TAA ^{181,184}. De plus, notre équipe a montré dans le mélanome que les TAA libérés dans le TME lors d'une infection avec un OV peuvent être internalisés par des cellules tumorales adjacentes qui sont ainsi reconnues par les lymphocytes T CD4 effecteurs spécifiques des TAA ¹⁸⁵. L'activité cytotoxique des lymphocytes s'exerce en déversant des granules cytotoxiques contenant de la perforine et du granzyme B dans les synapses immunologiques formées avec les cellules exprimant le complexe CMH/peptide qu'ils reconnaissent. Ils induisent également l'activation de voies apoptotiques dans ces cellules en exprimant FasL et le TNF- α qui se lient respectivement au récepteur CD95 (Fas) et au *TNF-receptor* (TNFR)1/2. Enfin, la sécrétion cytokinique des lymphocytes T renforce le recrutement d'autres cellules immunitaires.

MODULATION DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL PAR LES VIRUS ONCOLYTIQUES

L'induction de l'inflammation locale par les OV permet ainsi le recrutement de cellules de l'immunité innée ¹⁸⁶ et de lever le phénotype immunosuppresseur qu'elles acquièrent dans le TME

^{187,188}. De plus, l'activité oncolytique des OV est capable d'augmenter localement l'infiltrat lymphocytaire et conduit à l'expansion de clones spécifiques de TAA ^{189,190}. Cette réponse adaptative antitumorale permet alors la régression des tumeurs injectées avec le virus, mais aussi de métastases distantes du site d'injection ^{191,192}. Il semble alors que l'activité oncolytique des OV ne repose pas tant sur l'effet oncolytique direct qu'ils induisent par leur réplication abondante dans les cellules tumorales, mais plutôt sur leur capacité à lever l'immunosuppression du TME. Par exemple, la déplétion de cellules de l'immunité innée chez la souris limite l'activité oncolytique d'un MV modifié ¹⁹³. De plus, dans un autre modèle murin, des injections systémiques répétées de VSV sont plus efficaces qu'une seule injection, alors que la réplication virale est fortement limitée lors de la seconde administration ¹⁹⁴. En effet, les monocytes recrutés sur le site tumoral lors de l'injection initiale capturent les virions de la seconde injection et modulent le TME en levant l'activité antivirale des neutrophiles tout en favorisant le recrutement de lymphocytes T ce qui a pour conséquence d'améliorer la survie des souris.

Ainsi, l'inflammation locale déclenchée par les OV permet le basculement de l'environnement immunosuppresseur tumoral vers un microenvironnement attirant les différents effecteurs immunitaires. Afin d'améliorer encore cet effet, les OV sont parfois modifiés pour produire des transgènes au potentiel immunomodulateur ^{123,195}. À cette fin, beaucoup d'OV de première génération exprimaient le GM-CSF. Les virus plus récents expriment plutôt d'autres cytokines pro-inflammatoires comme de l'IL-12 ou de l'IL-15. Pour attirer les effecteurs immunitaires, les OV peuvent également exprimer des chimiokines comme CXCL9, CXCL10 ou CXCL11. D'autres stratégies cherchent à lever l'immunosuppression en faisant produire aux OV des inhibiteurs du TGF- β , des ligands capables d'induire la lyse des TAM ou des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire. Enfin, pour améliorer la reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes T, les OV peuvent être armés avec des *bispecific T cell engager* (BiTE) ou des antigènes de tumeurs, comme c'est le cas pour le MV-NY-ESO-1 que nous avons étudié dans l'équipe ¹⁹⁶.

LES VIRUS ONCOLYTIQUES EN CLINIQUE

La richesse et la complémentarité des mécanismes mis en place par les OV pour remodeler le TME en font des outils particulièrement intéressants pour le traitement de tumeurs avec un TME immunosuppresseur. Contrairement aux IPCI ou aux drogues qui ne ciblent qu'une seule molécule, leur activité est la conséquence de plusieurs effets qui s'exercent en parallèle. En effet, ils relarguent des TAA lors de la lyse tumorale, induisent l'immunité innée, promeuvent l'infiltration immunitaire au site tumoral, améliorent la reconnaissance et l'activité cytotoxique des cellules immunitaires, renversent l'activité tolérogène du TME. De plus, ce sont d'excellents vecteurs permettant l'expression d'autres agents thérapeutiques directement sur le site tumoral.

Trois OV sont aujourd'hui autorisés pour une utilisation clinique. Le premier à avoir été mis sur le marché est l'adénovirus H101 (Oncorine) qui est utilisé en combinaison avec une chimiothérapie pour le traitement des cancers squameux de la tête et du cou ou de l'œsophage ¹³⁸. Malgré son autorisation en Chine depuis 2005, les données relatives à son utilisation clinique et la survie des patients n'ont jamais été publiées. En 2015, le talimogene laherparepvec (T-VEC, Imlygic) a été le premier virus autorisé aux États-Unis et en Europe. Il s'agit d'un alphaherpesvirus humain 1 (HSV-1) avec une délétion des gènes *RL1* codant ICP34.5 et *US12* codant ICP47 pour respectivement sensibiliser le virus à la réponse IFN-I et l'empêcher d'inhiber la présentation d'antigènes par la cellule infectée ¹⁹⁷. Ce virus exprime également le GM-CSF supposé stimuler la réponse immunitaire. Ce virus est autorisé pour une administration intratumorale dans le mélanome métastatique non résectable. Récemment, l'HSV-1 G47Δ (teserpaturev, Delytact), a obtenu une autorisation temporaire d'utilisation au Japon pour le traitement du glioblastome récidivant ¹⁹⁸. En plus des gènes *RL1* et *US12* ce virus est également dépourvu du gène *UL39* qui code pour une enzyme impliquée dans la synthèse d'ADN.

Les premières données d'utilisation des OV confirment la sécurité de l'approche, mais suggèrent que leur efficacité en monothérapie est limitée ^{123,199}. Ainsi, malgré l'efficacité du T-VEC dans un essai clinique de phase III ^{200,201}, les résultats obtenus depuis sa mise sur le marché montrent un rôle systémique limité avec un taux faible de régression des lésions non injectées ²⁰². Afin d'améliorer l'efficacité des OV, de nombreuses combinaisons sont envisagées à des stades précliniques ou cliniques impliquant la chimiothérapie, la radiothérapie²⁰³, différentes drogues ^{204,205}, le transfert adoptif de cellules²⁰⁶, ou l'immunothérapie. Ces approches sont abordées et discutées dans la revue de Danni Lin ¹²³. Jusqu'à présent, l'approche la plus prometteuse semble être la combinaison avec des immunothérapies. Par exemple, la combinaison d'anti-PD1 avec le T-VEC améliore l'efficacité du virus dans le mélanome métastatique ²⁰⁷. Le T-VEC est capable d'attirer sur le site tumoral des lymphocytes T CD8 sensibles à l'inhibition de l'axe PDL1/PD1 ¹⁸⁹ suggérant que les patients ne répondant pas aux anti-PD1 en monothérapie pourraient être sensibles à la combinaison d'anti-PD1 avec le T-VEC. Cependant, un essai clinique de phase III dans le mélanome métastatique non résectable n'a pas montré d'amélioration de la survie des patients grâce à cette combinaison par rapport aux anti-PD1 seuls ²⁰⁸. Cet essai n'a toutefois pas été ciblé sur les patients ne répondant pas aux anti-PD1.

Six essais cliniques ont été menés dans le cadre du MPM (Tableau 1). Ce sont des tumeurs facilement accessibles et qui permettent au virus d'être administré en intra-tumoral ou en intra-pleural. Il s'agit d'études de phases I ou II ciblant différents cancers solides. Les résultats de ces essais montrent notamment un remodelage du TME du MPM vers un phénotype moins immunosuppresseur. Ainsi l'utilisation d'un adénovirus codant pour le GM-CSF améliore

l'infiltration immunitaire et polarise les macrophages tumoraux vers un phénotypes pro-inflammatoires ²⁰⁹, tandis que l'utilisation d'un HSV-1 induit une réponse immunitaire antitumorale ²¹⁰.

Tableau 1 | Essais cliniques de phase I/II du MPM

Virus	N	Administration	Combinaison	Pays	Etat	Référence
MV-NIS	15	Intrapleurale	Pémétrexed et cisplatine	Etats-Unis	Terminé	NCT01503177
HSV1716 (HSV-1)	12	Intrapleurale	Pémétrexed et cisplatine	Royaume-Uni	Terminé	NCT01721018 ²¹⁰
ONCOS-102 (Adénovirus 5/3)	31	Intratumorale	Pémétrexed et cisplatine/carboplatine	France, Espagne	Inconnu	NCT02879669 ²⁰⁹
Tbio-6517 (VV, Copenhague)	27	Intratumorale / intraveineuse	Pembrolizumab	Etats-Unis	En cours	NCT04301011
T3011 (HSV-1)	74	Intraveineuse	-	Chine	En cours	NCT05598268
H101 (Adénovirus 5)	15	Intratumorale / Intrapleurale	inhibiteur de PD-1	Chine	En cours	NCT06031636

HSV, alphaherpes virus humain ; MV, virus de la rougeole ; N, nombre de patients ; NIS, symporteur d'iodure de sodium ; PD-1, Programmed cell Death 1 ; VV, virus de la vaccine

Du côté préclinique, plusieurs grands axes sont envisagés pour améliorer la prise en charge thérapeutique avec les OV ²¹¹. La plupart soulignent l'importance d'une meilleure caractérisation chez l'humain de la réponse immunitaire qu'ils induisent. Celle-ci permettra d'améliorer l'activité oncolytique des OV en les combinant avec d'autres thérapies ou en leur faisant exprimer différents transgènes améliorant la réplication virale ou modulant plus finement la réponse immunitaire.

LE VIRUS DE LA ROUGEOLE

De nombreuses études s'intéressent aux souches atténuées du virus de la rougeole (MV, *measles virus*) pour traiter les cancers, dont le MPM ^{212,213}. Ces souches possèdent un très bon profil d'innocuité avec un recul de plus de 60 ans de vaccination ²¹⁴. Elles démontrent spontanément un fort potentiel lytique et immunostimulateur dans les tumeurs et peuvent être facilement modifiées génétiquement pour optimiser leur efficacité avec une grande capacité d'insertion de gènes étrangers ¹⁹⁵.

LA ROUGEOLE

Le MV est un virus particulièrement contagieux à l'origine de la rougeole. Une seule personne infectée peut générer entre 12 et 18 nouveaux cas de rougeole dans une population non vaccinée ²¹⁵. Heureusement, un vaccin très peu couteux et efficace existe depuis 1965 ^{214,216}. Il est utilisé en France depuis les années 1980 et a permis de réduire drastiquement le nombre de cas de rougeole, l'incidence en 1987 étant de 546 000 cas ²¹⁷ pour 15 cas déclarés en 2022 ²¹⁸.

Les premiers symptômes de la rougeole apparaissent 8 à 12 jours après l'exposition au virus et comprennent une forte fièvre, une toux, une perte d'appétit, une rhinorrhée ainsi que des taches de Koplick plus ou moins marquées dans la bouche ²¹⁵. Plus tardivement, des éruptions érythémateuses, caractéristiques de la rougeole, apparaissent sur la totalité du corps. Ces symptômes durent environ sept à dix jours. Le MV, en infectant les cellules immunitaires, induit également une immunosuppression pouvant durer plusieurs mois laissant le champ libre à des infections opportunistes de gravités variables ²¹⁹. Celles-ci sont responsables de la plupart des décès liés à la maladie, en particulier chez les enfants et les patients souffrant de malnutrition. Le reste des décès est imputable à des complications neurologiques.

STRUCTURE ET GENOME VIRAL

Le MV est un petit virus enveloppé de la famille des *Paramyxoviridae* du genre *Morbillivirus* ²¹⁵. Son génome est constitué d'un ARN simple brin linéaire négatif non segmenté, d'une taille de 15,9kB, contenant 6 gènes codant pour 8 protéines (Figure 10). L'ARN est contenu dans un complexe ribonucléoprotéique (RNP) où le génome viral est empaqueté par la nucléoprotéine (N), qui le protège des nucléases, et est associé à la protéine large (L) et la phosphoprotéine (P) qui est un facteur de processivité de la protéine L. Le complexe protéique formé par L et P joue un rôle d'ARN polymérase. À ce complexe est fixée la protéine de matrice (M) qui provoque la courbure d'une membrane lipidique dérivée de la membrane cellulaire dans laquelle sont ancrées deux glycoprotéines : la protéine de fusion (F) et l'hémagglutinine (H). Les deux autres protéines, V et C, codées par le gène de la protéine P, sont des facteurs de virulence permettant au MV d'échapper

à la réponse immunitaire innée et de retarder l'apoptose. La protéine C sert également à la régulation de la réplication virale en améliorant l'efficacité de la polymérase ¹⁴⁸.

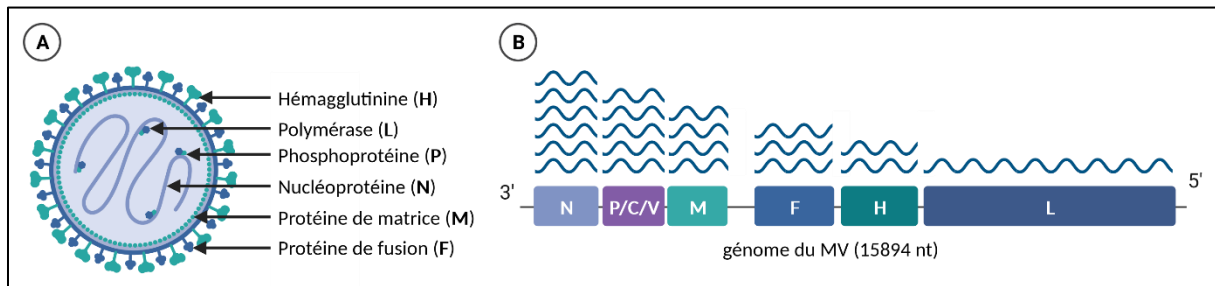


Figure 10| Le virus de la rougeole (MV). (A) Structure du virion : les 6 protéines N, P, M, F, H, L, définissent l'architecture du virus. (B) Génome du MV, les 8 protéines du MV sont codées par 6 gènes portés par un ARN simple brin linéaire négatif. La transcription s'effectue de 3' en 5' en suivant un gradient de la protéine N à la protéine L, c'est-à-dire que l'expression des protéines en 3' sera plus précoce et abondante que celles en 5'. Les facteurs de virulence V et C sont respectivement produits grâce à un épissage alternatif et un changement du cadre de lecture du gène P.

TROPISME

La contamination par le MV s'effectue par contact direct ou par l'air et se propage le long de l'appareil respiratoire. Le MV infecte d'abord les cellules immunitaires avant les cellules épithéliales. La protéine virale H se fixe au récepteur *Signaling Lymphocytic Activation Molecule* (SLAM, aussi appelé CD150), présent sur les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B et T activés ²²⁰. Les macrophages alvéolaires et les DC résidentes infectés migrent alors jusqu'aux ganglions lymphatiques où le virus peut se répliquer, infecter les lymphocytes B et T, puis se disséminer dans l'hôte grâce à ces derniers ²¹⁵. Lors de cette propagation de l'infection, les virus produits peuvent infecter les cellules épithéliales des voies respiratoires en se liant à la molécule de surface nectin-4 exprimée sur leur face basale ²²¹. La mort de ces cellules déclenche une toux intense avec projection de gouttelettes contaminées hautement contagieuses qui permet de disséminer le virus à d'autres hôtes ²¹⁵.

Le MV est également capable d'infecter les cellules neuronales ²²²⁻²²⁵ par des mécanismes encore mal définis dont l'exploration est un sujet central de la recherche actuelle sur le MV. En effet, ce tropisme entraîne des complications neurologiques létales ^{215,226,227}, comme la *measles inclusion-body encephalitis* (MIBE) et la *subacute sclerosing panencephalitis* (SSPE). A ce jour, aucun des récepteurs connus de la souche sauvage du MV n'est présent dans le système nerveux central et la dissémination du virus semble reposer sur l'apparition de mutants aux propriétés hyperfusogènes ^{228,229}. Plusieurs études ont ainsi montré l'acquisition de mutations dans les gènes codants pour la protéine de matrice, la protéine de fusion et l'hémagglutinine virale pouvant

expliquer la propagation virale ²²⁶. En effet, les mutations « pertes de fonctions » du gène M limitent la capacité du virus à bourgeonner mais peuvent favoriser sa réplication car la protéine M exerce normalement un rétrocontrôle négatif sur l'activité de la polymérase virale. De plus, les mutations de M favorisent l'apparition de mutations dans le gène de la protéine H ²³⁰ ainsi que dans le domaine intracytoplasmique de la protéine F ^{231,232}, permettant au MV d'acquérir des propriétés hyperfusogènes qui facilitent sa dissémination malgré le bourgeonnement limité du virus ²²⁹. Différentes hypothèses expliquent la dissémination du MV dans le système nerveux central par la liaison avec un récepteur inconnu de basse affinité ^{226,227}, le transfert de cytoplasme induit par nectin-4 ²³³, des microfusions impliquant la liaison de F avec le récepteur Neurokinin-1 au niveau des synapses ²³⁴ ou faisant intervenir les molécules d'adhésion cellulaires CADM1 et CADM2 ²³⁵⁻²³⁷. Ainsi, les mécanismes sous-tendant le tropisme neuronal du MV ne sont pas pleinement élucidés mais ce domaine de connaissances est en pleine expansion.

CYCLE REPLICATIF DU MV

L'entrée du MV dans une cellule fait suite à l'interaction d'un dimère de la glycoprotéine H avec les récepteurs d'entrée virale (Nectin4 et CD150 ainsi que CD46 pour la souche vaccinale) présent à la surface de la cellule hôte (Figure 11) ^{215,238}. Cette interaction induit une modification du dimère qui se lie à la protéine F, permettant un changement de sa conformation et son activation. Elle permet la fusion de la membrane virale avec la membrane cellulaire et la libération du complexe ribonucléoprotéique dans le cytoplasme. Les protéines F et H qui restent en surface de la cellule hôte, ainsi que celles nouvellement produites interagissent avec les récepteurs d'entrée présents sur les cellules voisines. La fusion qui en découle permet l'obtention d'une structure cellulaire multinucléée appelée syncytia, caractéristique d'une infection par le MV, qui facilite la propagation virale.

Dans le complexe ribonucléoprotéique, la nucléocapside sert de matrice pour la transcription et la réplication qui sont réalisées par le complexe ARN polymérase ARN dépendante (RdRp), formé par les protéines P et L ²³⁸.

Lors de la transcription, le complexe RdRp se lie au génome encapsidé au niveau du promoteur 3' ^{215,238}. Il transcrit ensuite tous les ARNm viraux avec une efficacité décroissante en reconnaissant les signaux de démarrage et d'arrêt encadrant les gènes viraux. Les ARN messagers sont coiffés et polyadénylés par la protéine L pendant leur synthèse. Ces ARN messagers sont traduits en protéines virales en s'associant aux ribosomes de la cellule hôte.

L'ARN viral permet également à la synthèse d'un brin d'ARN complémentaire positif qui sert de matrice pour la réplication du nouveau génome viral ^{215,238}. La réplication commence probablement lorsque suffisamment de protéine N a été produite pour pouvoir encapsider l'ARN

génomique immédiatement après sa synthèse. Le complexe RdRp réplique alors l'ensemble du génome viral sans reconnaître les signaux transcriptionnels, et l'ARN répliqué n'est ni coiffé ni polyadénylé.

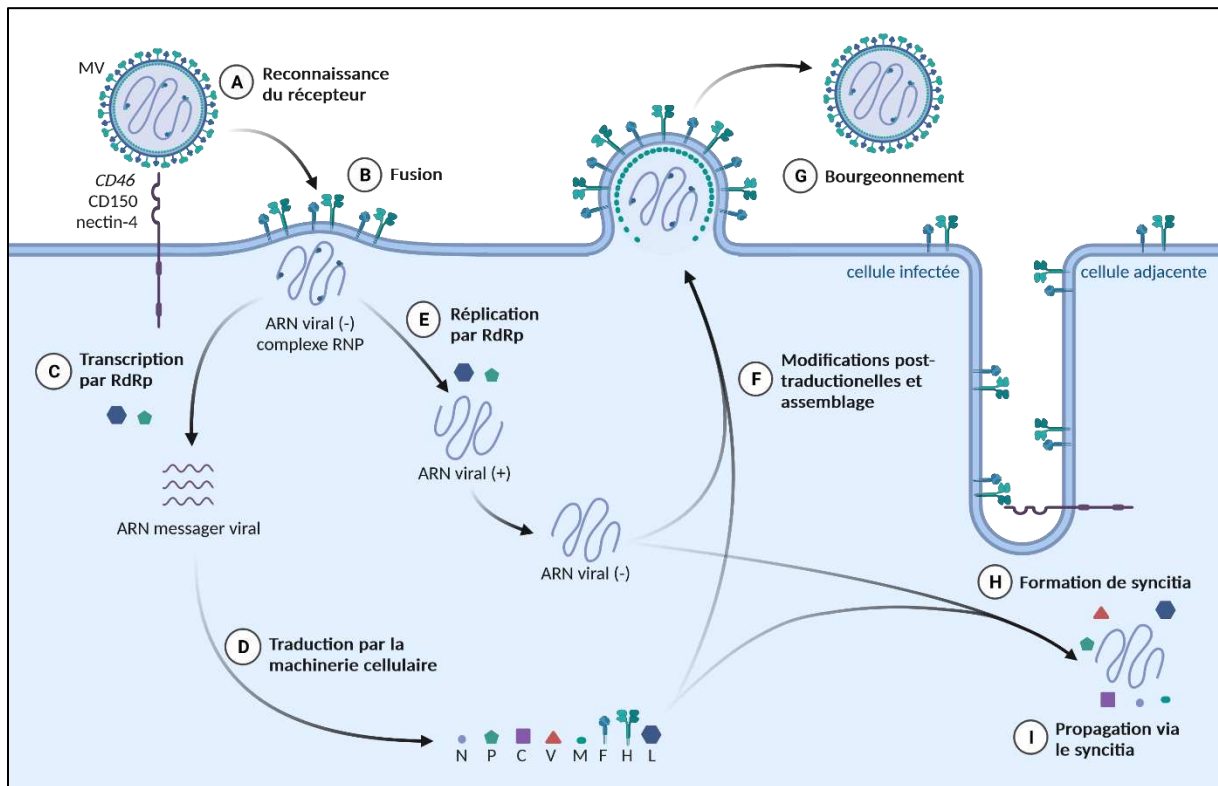


Figure 11 | Cycle de réplication du MV. Le MV se lie à son récepteur (A) pour fusionner (B) avec la membrane cellulaire. L'ARN viral simple brin négatif est alors transcrit (C) en ARN messagers par la protéine L qui sont ensuite traduits (D) en protéines grâce aux ribosomes cellulaires. La réplication (E) de l'ARN viral passe par un intermédiaire ARN simple brin positif qui sert de matrice pour la production de nouveaux ARN simples brins négatifs. Ces ARN sont ensuite assemblés (F) avec les nouvelles protéines pour former des virions qui quittent la cellule par bourgeonnement (G) ou se propagent à travers le syncytia (H-I) formé grâce aux protéines H et F.

Une fois la réplication terminée, le complexe ribonucléoprotéique nouvellement formé s'assemble avec la protéine de matrice (M) sous la membrane plasmique et bourgeonne pour relarguer les nouveaux virions ²³⁸. Ils pourront alors infecter d'autres cellules.

LA SOUCHE VACCINALE DU MV

Le MV fut isolé pour la première fois en 1954 chez un patient nommé Edmonston, qui donna son nom à la souche virale ²³⁹. Ce virus fut ensuite cultivé successivement sur des cellules rénales, des cellules embryonnaires et des cellules de la membrane amniotique humaine permettant en 1963 l'obtention du premier vaccin atténué contre la rougeole ²¹⁶. Ce vaccin était toutefois très réactogène. C'est pourquoi il subit à nouveau des passages successifs sur différents

types de cellules animales et humaines. Ceux-ci permirent la génération de plusieurs souches vaccinales non pathogènes ayant conservé leurs propriétés immunogènes comme la souche Schwarz ^{240,241}. Cette souche atténuée du virus sert à vacciner contre la rougeole dans le vaccin ROR (rougeole, oreillon, rubéole) commercialisé sous le nom de Priorix. Sa production est relativement aisée et peut être réalisée avec un titre viral élevé pour son utilisation en immunothérapie.

La souche vaccinale Schwarz est particulièrement bien caractérisée avec 42 mutations dans son génome qui diffèrent de la souche sauvage ²⁴⁰. Le génome non segmenté du MV est stable et contrairement à d'autres virus à ARN présente un très faible risque de mutation (4/10000 bases) ²⁴². Cela rend très peu probable un retour à une forme pathogène du virus, qui n'a d'ailleurs jamais été observé.

Dans les années 1960-70, des patients souffrant de leucémies ont vu leur état s'améliorer après avoir contracté la rougeole ¹²¹. L'excellent profil de sécurité de la souche vaccinale a permis d'envisager son utilisation en immunothérapie oncolytique. Il a alors été montré par notre équipe et par d'autres, que ces souches présentaient des capacités oncolytiques spontanées contre différents cancers tout en épargnant les cellules saines. De plus, la réplication virale dans les cellules tumorales conduit à une mort immunogène qui déclenche une forte réponse antitumorale. Enfin, le génome du MV est facilement modifiable, permettant ainsi de lui faire exprimer différents transgènes permettant de suivre sa réplication, de coder pour des molécules thérapeutiques, d'améliorer sa spécificité pour les cellules tumorales, ou de potentialiser son action immunomodulatrice ¹⁹⁵.

MECANISMES DE SENSIBILITE DES CELLULES TUMORALES AU MV

SUREXPRESSION DES RECEPTEURS D'ENTREE DU MV

L'utilisation des souches atténuées du MV comme virus oncolytique fait suite à la mise en évidence de la permissivité des cellules tumorales à sa réplication. Cette activité oncolytique spontanée a initialement été attribuée à une meilleure entrée du virus dans les cellules tumorales ¹²⁵. Au cours des nombreux passages cellulaires de la souche vaccinale, celle-ci a acquis une mutation qui permet à la protéine H d'interagir avec le récepteur CD46 en plus des récepteurs CD150 et nectin-4 ²⁴³. Le récepteur CD46 est un régulateur négatif de la lyse médiée par le complément, présent sur toutes les cellules humaines, mais qui est souvent fortement surexprimé par les cellules tumorales pour résister à la lyse provoquée par le complément. Le récepteur nectin-4 est, quant à lui, surexprimé dans l'adénocarcinome pulmonaire ou colique, ainsi que dans les cancers ovariens et du sein ²¹². Dans le MPM, l'infection par la souche vaccinale du MV dépend principalement de l'expression de CD46 plutôt que de nectin-4 et de CD150 ¹³⁷. En conséquence,

la sélectivité du MV pour les cellules tumorales a d'abord été attribuée à la surexpression du récepteur CD46 sur ces dernières ¹²⁵. Ce lien semble toutefois dépendre du cancer étudié. Notre équipe a montré dans le MPM et le mélanome, que l'activité oncolytique du MV ne dépendait pas du niveau d'expression de CD46 ^{142,244} alors qu'elle semble corrélée à l'expression de ce récepteur dans le myélome ¹²⁷.

ALTERATIONS DE LA REPONSE ANTIVIRALE

De nombreux travaux, dont ceux de l'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse, ont montré que la sélectivité de la souche vaccinale du MV était principalement déterminée par les défauts de la réponse antivirale IFN-I des cellules cancéreuses ^{94,142,244-247}. Les lignées tumorales ne présentant pas ces défauts étaient insensibles à l'action oncolytique du MV, y compris avec une expression de CD46 très élevée. Cette sélectivité découle de l'incapacité des souches atténuées du MV à bloquer les défenses cellulaires antivirales médiées par la réponse IFN-I.

Sensibilité de la souche vaccinale à la réponse IFN-I

Dans la cellule tumorale, le MV est reconnu par les PRR, en particulier Rig-I, Mda5 qui déclenchent une réponse pro-inflammatoire et antivirale ¹⁵¹. L'analyse transcriptomique de lignées de glioblastome infectées avec le MV montre une augmentation de l'expression de Rig-I, ainsi que d'*IFNB1*, *STAT1* et d'ISG tels que l'ISG15, les *MX dynamin like GTPase 1* (MX1) et MX2 et les *2'-5'-oligoadenylate synthase 1* (OAS1) et OAS2 capables de limiter la réplication virale ²⁴⁸.

Bien que les ISG capables d'inhiber complètement le MV soient encore assez mal décrits, quelques-uns ont été mis en évidence et interviennent aux différentes étapes du cycle réplcatif viral. Par exemple, l'entrée du MV est limitée par la présence de l'*interferon induced transmembrane protein 1* (IFITM1) qui modifie la fluidité de la membrane de la cellule en jouant sur ses composés lipidiques. Ainsi, il a été montré qu'une augmentation d'IFITM1 diminue la réplication virale ²⁴⁵. De même l'expression de la *Guanylate Binding Protein 2 and 5* (GBP2/5) inhibe la réplication du MV en inhibant l'activité de la Furine, une enzyme indispensable à la formation de l'enveloppe du virus ²⁴⁹. L'augmentation de l'expression de la cytidine déaminase *apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3G* (APOBEC3G) est également capable de limiter la production de nouveaux virions ²⁵⁰. Cette enzyme induit la surexpression de *DNA Damage inducible transcript 4* (DDIT4, aussi appelé REDD1) ce qui impacte le métabolisme cellulaire et conduit entre autres à un arrêt de la traduction ²⁵¹. Elle permet également la surexpression de *KDEL endoplasmic reticulum protein retention receptor 2* (KDEL2) qui limite la disponibilité des protéines chaperonnes de la cellule pour empêcher le repliement et le transport des glycoprotéines H et F virales à la membrane ²⁵². L'expression de la vipérine dans les cellules tumorales permissives à la réplication du MV empêche quant à elle le bourgeonnement du virus

²⁵³. Tandis que la tethérine peut empêcher la formation de syncytia en se liant à la glycoprotéine H du MV ²⁵⁴.

Dans toutes ces études, l'inhibition médiée par les ISG étudiés est partielle, suggérant que l'action combinée de plusieurs ISG est nécessaire pour inhiber totalement la réplication du MV. Cette hypothèse est soutenue par l'étude de Shoggins et al en 2014 qui évaluait l'effet de plus de 350 ISG sur 14 virus ²⁵⁵. L'activité du MV était réduite par des régulateurs de PRR comme *Tripartite motif-containing protein 25* (TRIM25), des facteurs de transcription tels que IRF2 ou encore des enzymes responsables de modifications de bases ou régulant la production de protéines virales. Toutefois, à l'inverse des autres virus étudiés, aucun de ces 350 ISG n'est capable d'inhiber à lui seul plus de 50% de la réplication du MV. Cela confirme que l'action combinée de plusieurs de ces ISG est nécessaire pour stopper totalement la réplication du MV.

La souche sauvage pathogène du MV utilise 3 protéines codées par le même gène, les protéines P, V et C, pour contourner la réponse IFN-I ^{256,257}. Elles agissent en amont de la production d'interféron, mais aussi sur la cascade de signalisation après le récepteur IFNAR. La protéine V régule négativement l'action des RLR, qui ne peuvent pas déclencher la voie de signalisation MAVS. Elle agit également en empêchant l'activité transcriptionnelle des facteurs IRF3, IRF7 et NFκB et ainsi la production d'IFN-I. Enfin, elle inhibe la transduction du signal après IFNAR en interagissant avec JAK1, STAT1, STAT2 et le facteur de transcription IRF9. La protéine P régule négativement NFκB et empêche la phosphorylation et donc la translocation nucléaire de STAT1. La protéine C est capable de bloquer l'activation de la PKR, d'inhiber l'expression des gènes dépendants de NFκB en se liant à sa sous-unité p65 et de bloquer l'activité du promoteur du gène *IFNB1* dans le noyau indépendamment d'IRF3.

L'atténuation de la souche vaccinale par rapport à la souche sauvage du MV s'explique en grande partie par l'inactivation fonctionnelle de ces facteurs de virulence ^{240,258,259}. Les diverses mutations des gènes P, V et C rendent la souche vaccinale du MV incapable de limiter l'expression des ISG des cellules saines et favorisent sa réplication dans les cellules tumorales ayant des altérations de la voie IFN-I.

L'action oncolytique du MV dépend des défauts de la réponse IFN-I

En 2015, Carole Achard a étudié la sensibilité à la souche vaccinale du MV de 22 lignées de MPM (Figure 12). Elle a montré que sept d'entre elles possèdent une réponse IFN-I fonctionnelle qui contrecarre la réplication du virus ¹⁴². Les cellules saines (fibroblastes, cellules bronchiques, endothéliales et mésothéliales) inhibent, par cette même voie, la réplication du virus. En revanche, 15 lignées sont permissives à la réplication du MV, dont 11 lignées qui ne produisent pas d'IFN-I en réponse au MV. L'ajout d'IFN-I exogène sur ces cellules permet d'inhiber la réplication virale.

Des résultats similaires ont été observés *in vitro* sur une collection de 13 lignées de mélanome ²⁴⁴ ainsi que dans des lignées tumorales de sarcomes ²⁴⁶. À l'inverse, l'inhibition de la signalisation après IFNAR par le *ruxolitinib*, a permis de sensibiliser les cellules saines ainsi que les cellules tumorales de mélanome et de MPM à la souche vaccinale du MV ^{94,244}. Dans l'étude de Carole Achard, les 4 lignées permissives à la réplication du MV, mais capables de produire de l'IFN-I expriment également l'ISG Mx1 en réponse au virus, indiquant que la cascade de transduction après le récepteur IFNAR est fonctionnelle. Il est cependant possible que certains ISG nécessaires à l'inhibition de la réplication du MV soient absents ou non exprimés dans ces lignées, les rendant partiellement sensibles à l'action oncolytique du MV.

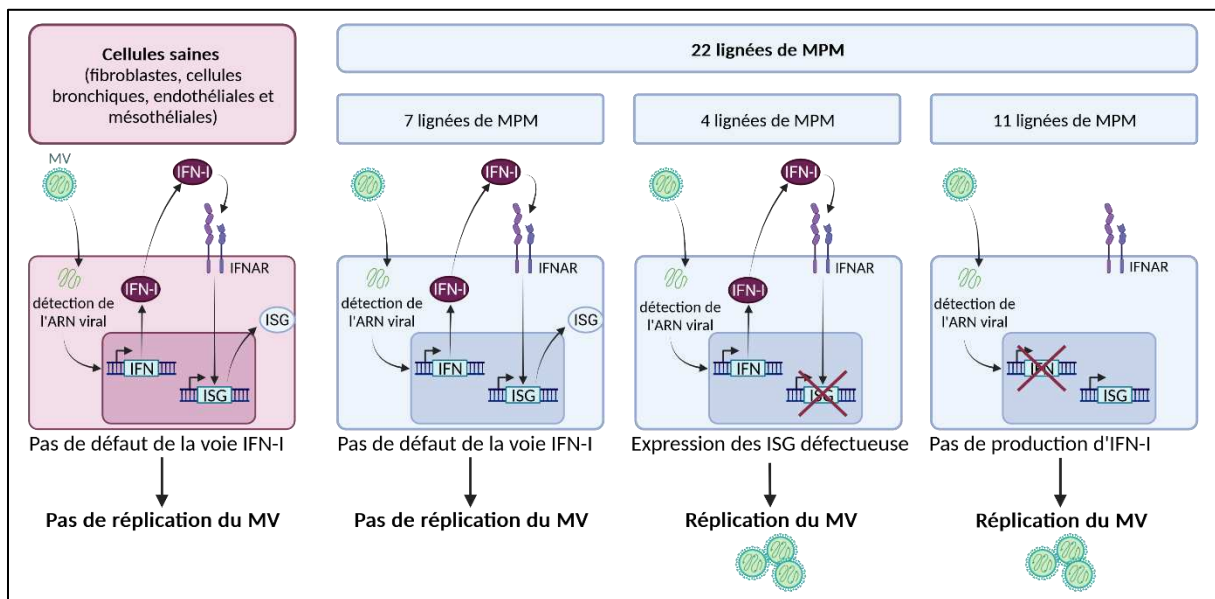


Figure 12 | Défauts de la réponse IFN-I dans le MPM permettant l'action oncolytique du MV. IFN, interféron ; IFNAR, *interferon-alpha/beta receptor* ; ISG, *interferon stimulated genes* ; MV, virus de la rougeole.

D'autres équipes ont confirmé depuis l'influence majeure de cette réponse antivirale sur l'activité oncolytique du MV. En ajoutant progressivement des mutations oncogéniques dans des cellules souches mésenchymateuses de la moelle pour mimer le développement tumoral, Sarah Aref et ses collaborateurs ont montré une inhibition progressive de la réponse IFN-I et une augmentation de l'activité oncolytique du MV ²⁴⁵. Cet article définit les défauts de la voie IFN-I qui accompagnent la transformation maligne comme un facteur majeur de la sélectivité de la souche vaccinale du MV. En comparant les voies de signalisation activées entre des lignées de glioblastome résistantes et sensibles à l'action du MV, Cheyne Kurokawa et ses collaborateurs ont identifié une signature de gènes, essentiellement des ISG, à partir de laquelle ils ont réalisé un algorithme visant à prédire quelles seraient les cellules tumorales résistantes ou sensibles à l'action oncolytique du virus ²⁴⁷. Les prédictions de cet algorithme ont été validées dans des

xénogreffes de glioblastome et de cancer ovarien et chez 10 patients dans un essai clinique de phase I et montrent une corrélation inverse entre l'expression d'ISG et la réplication virale. En effet, les patients avec une réponse IFN-I activée dans la tumeur avant l'injection du virus répondent moins à la thérapie que les patients dépourvus de réponse IFN-I. une meilleure connaissance des ISG bloquant le MV pourrait permettre de prédire l'efficacité d'un traitement basé sur ce virus et d'ajuster les prises en charges thérapeutiques pour chaque patient.

Une étude publiée par l'équipe a identifié le défaut de réponse IFN-I le plus fréquemment retrouvé dans le MPM comme étant la délétion homozygote des gènes codant les IFN-I que l'on retrouve chez environ 20% des patients ⁹⁴. Sur les 22 lignées de MPM étudiées dans l'étude de Carole Achard, Tiphaine Delaunay a montré que huit d'entre elles ont perdu les gènes IFN-I et sont incapables de produire des IFN-I permettant d'inhiber la réplication du virus.

Ainsi les défauts de la réponse IFN-I des cellules tumorales permettent l'action oncolytique de la souche vaccinale du MV tout en préservant les cellules saines qui possèdent une réponse IFN-I fonctionnelle. De plus ces articles suggèrent que les différents défauts de la réponse IFN-I sont responsables des degrés de sensibilité des cellules tumorales au MV.

INDUCTION DE LA REPONSE ANTITUMORALE PAR LE MV

MORT IMMUNOGENE

Le mécanisme précis par lequel la mort cellulaire advient lors d'une infection par le MV est encore mal caractérisé. Les deux voies les plus étudiées sont l'apoptose ou l'autophagie ²⁶⁰.

La lyse des cellules tumorales médiée par le MV et la perte de l'intégrité membranaire des syncytia sont particulièrement immunogènes. Elles libèrent de nombreux TAA, de DAMP et de PAMP. Dans le MPM, les cellules infectées avec le MV produisent des niveaux élevés d'*heat shock protein 70* (HSP70), une molécule connue pour favoriser la présentation croisée par les DC ¹⁸². Dans le mélanome, l'ARN double brin, conséquence du cycle réplicatif du MV, déclenche la production d'IFN-I par les cellules ce qui entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-8 et CCL5. De plus la mort de la cellule induit la libération d'HMGB1 ¹⁸¹. Ce relargage d'HMGB1 est retrouvé dans le carcinome hépatocellulaire où l'infection avec le MV favorise également la translocation membranaire de calréticuline ainsi que la libération d'ATP ²⁶¹.

ACTIVATION DES CELLULES PRESENTATRICES D'ANTIGENES

Comprendre comment cette mort immunogène induite par le MV permet l'initiation d'une réponse antitumorale est un des axes de recherche de l'équipe dans laquelle j'ai réalisé ma thèse. Lors de son post-doctorat dans l'équipe, Anne Gauvrit avait d'abord comparé l'effet de la mort

cellulaire tumorale induite par le MV ou induite par des rayonnements ultraviolets sur des DC dérivées de monocytes¹⁸². Seule la mort immunogène déclenchée par le virus est capable d'activer les DC immatures et d'induire le « *cross-priming* » d'un antigène tumoral, la mésothéline, aux lymphocytes T CD8. Jean-Baptiste Guillaume a ensuite montré avec des lignées cellulaires de mélanome exprimant NY-ESO-1, que l'infection par le MV est nécessaire pour permettre aux pDC d'induire la présentation croisée de cet antigène à des lymphocytes T⁵². Les DC matures appréhendent les antigènes des cellules tumorales qu'ils ont phagocytées en peptides, qu'elles présentent sur les molécules de CMH-I^{52,182}. Les complexes CMH/peptide (signal 1) sont ensuite reconnus par les lymphocytes T CD8 dans un contexte de costimulation (signal 2) en présence de molécules inflammatoires (signal 3). Cela déclenche la prolifération et l'activation des lymphocytes T CD8 qui sécrètent alors de l'IFN- γ et acquièrent des fonctions cytotoxiques^{52,181}.

Jean-Baptiste Guillaume et Carole Achard ont montré que le virus est reconnu par TLR7 dans les phagosomes des pDC, tandis que, dans les pDC et les cDC, les récepteurs Rig-I et Mda5 reconnaissent l'ARN double brin^{52,146}. Cette reconnaissance déclenche une cascade de signalisation aboutissant à la maturation des DC, avec une surexpression des marqueurs de costimulation CD40, CD80, CD83, CD86 et HLA-DR, et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, notamment IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- α et un peu d'IL-12^{52,146,181,182}. La production d'IFN- α induit l'expression de TRAIL à la surface des DC ce qui leur permet d'exercer une action cytotoxique¹⁴⁶. De plus, Carole Achard a également montré que les pDC activées produisent de grandes quantités de granzyme B.

MIGRATION ET FONCTIONS EFFECTRICES DES LYMPHOCYTES T

Une fois activés, les lymphocytes T doivent migrer jusqu'au site tumoral. Là encore, l'infection avec le MV semble soutenir la réponse antitumorale. Notre équipe a montré que l'infection induit l'expression de CCL5, CXCL10 et CXCL11, susceptibles d'attirer les lymphocytes T, par les cellules de MPM⁹⁴. Ces résultats confirment ceux obtenus dans le glioblastome et le carcinome hépatocellulaire. En effet, après infection, les cellules de glioblastome sécrètent davantage de CCL5 et CXCL10 *in vitro*²⁴⁸ tandis que, dans un modèle de xénogreffe de carcinome hépatocellulaire, des concentrations élevées de CCL3, CCL4, CCL5 et CXCL10 ont été mises en évidence²⁶¹.

Caractériser si les lymphocytes T migrent effectivement sur le site tumoral est en revanche beaucoup plus compliqué à mettre en évidence. Cela nécessite des modèles murins immunocompétents dont les cellules tumorales peuvent être infectées par le MV. À cette fin, le virus ou les cellules murines sont modifiés pour induire un tropisme du MV vers une molécule de surface des cellules tumorales murines. Par exemple, la lignée murine de cancer colorectal MC38

peut être modifiée pour exprimer le *carcinoembryonic antigen* (CEA) qui est reconnu par un MV ciblant cet antigène ²⁶². Dans ce modèle, des lymphocytes T sont retrouvés en périphérie de la tumeur 7 jours après l'injection du virus. De la même manière, un infiltrat de lymphocytes T CD4 et CD8 est retrouvé dans des souris immunocompétentes porteuses de carcinomes pulmonaires sous-cutanés ²⁶³. Dans un modèle de mélanome il a été rapporté une augmentation de l'infiltrat des cellules T CD8 productrices d'IFN- γ et une augmentation du ratio lymphocytes effecteurs/régulateurs ²⁶⁴.

Une fois au site tumoral, les lymphocytes T CD8 exercent une activité cytotoxique dirigée contre les cellules tumorales présentant des TAA sur leur CMH-I. L'infection *in vitro* par le MV de cellules de glioblastome augmente l'expression de *transporter associated with antigen processing* TAP et de CMH-I renforçant la capacité des cellules tumorales à présenter des TAA ²⁴⁸. De plus, Tiphaine Delaunay a montré que l'infection par le MV libérait des TAA, comme NY-ESO-1, dans le TME du mélanome pouvant être internalisé par les cellules tumorales adjacentes qui sont à leur tour reconnues par les lymphocytes T CD4 effecteurs ¹⁸⁵.

Deux études montrent 40% de rémissions tumorales complètes après virothérapie par le MV dans le modèle murin de cancer colorectal MC38CEA ^{265,266}. De manière intéressante, quatre et six mois après rémission, respectivement 4/4 et 3/4 des souris sont protégées contre la greffe et le développement d'une nouvelle tumeur sur un site distant, mettant en évidence le développement d'une réponse mémoire antitumorale systémique. En outre, ces deux études ont montré une amélioration de l'action antitumorale du MV lorsqu'il est modifié pour exprimer IL-12 ou IL-15 qui favorise l'activation des lymphocytes T et des NK. Cela souligne qu'une partie de l'action oncolytique du MV passe par ses effets immunomodulateurs dans le TME.

MODIFICATION DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL

En dehors de son effet sur les DC et les lymphocytes T, l'action immunomodulatrice du MV est relativement peu étudiée et caractérisée dans le TME.

Il a cependant été montré que l'infection avec la souche vaccinale du MV recrute des neutrophiles au site tumoral ²⁶⁷ et induit leur activation ²⁶⁸. Ceux-ci sécrètent alors des cytokines antitumorales comme l'IL-8, TNF- α , MCP-1 et IFN- α ainsi que la sécrétion de TRAIL.

La coculture de NK avec des cellules de mélanome infectées par le MV montre une surexpression du marqueur d'activation CD69 et du marqueur de dégranulation CD107 ¹⁸¹. Dans des cocultures de lignées de sarcomes, l'infection augmente l'activité cytotoxique des NK par le relargage de granzyme et perforine ²⁶⁹.

Dans un modèle de cancer du sein, Tan et al. montrent que la présence de macrophages dérivés de monocytes améliore l'activité oncolytique de deux paramyxovirus, dont le MV ¹⁸⁸. Celle-ci augmente l'expression de la molécule de costimulation CD80 et le relargage de molécules pro-inflammatoires telles qu'IL-1b, TNF- α et IL-6 ainsi que des cytokines chimio-attractrices telles que CXCL9 et CXCL10. Ces modifications traduisent un changement phénotypique des macrophages associés aux tumeurs vers un phénotype pro-inflammatoire lors de l'infection.

Dans le cancer ovarien, l'infection par le MV augmente l'expression de PDL1 ²⁷⁰. Cette augmentation de l'expression est également retrouvée dans un modèle de glioblastome ²⁷¹. La combinaison du MV avec un anti-PD1 *in vivo* augmente significativement la survie des souris. De plus, l'imagerie montre un afflux de lymphocytes T dans le cerveau en réponse aux traitements et l'analyse de cette population montre qu'ils sont activés. La synergie de cette combinaison est également montrée dans le glioblastome et l'inhibition de la réponse IFN-I dans ce modèle conduit à une diminution de l'expression de PD-L1 ²⁷².

ESSAIS CLINIQUES DU MV

La souche vaccinale du MV a été évaluée dans près d'une vingtaine d'essais cliniques de phase I et II (Tableau 2). La plupart de ces essais ont été réalisés à la Mayo Clinic de Rochester aux États-Unis par les groupes d'Evanthia Galanis et de Stephen J Russell. Ils utilisent des MV modifiés codant une partie du CEA ou le symporteur d'iodure de sodium (NIS) afin d'assurer un suivi de la réplication *in vivo* ^{273,274}. Ce suivi est effectué en mesurant la concentration de transcrits du CEA dans le sang ou par imagerie après injection d'iode¹²⁵. La totalité de ces essais souligne l'innocuité du traitement et rapporte une efficacité thérapeutique variable selon les cancers et les patients traités ^{212,213}.

Lors d'un essai clinique contre le myélome multiple, l'injection par voie intraveineuse d'une dose de 10^{11} virions de MV-NIS, ce qui correspond à 10^8 fois la dose vaccinale administrée en sous-cutanée aux enfants, a été assez bien tolérée chez deux patients non immunisés contre le MV, mettant en évidence la sécurité de la souche vaccinale en thérapie ²⁷⁵. Bien que les deux patients aient répondu au traitement, seul l'un des deux a montré une rémission totale et complète à tous les sites de la maladie. La poursuite de cet essai montre une réponse transitoire chez quatre autres personnes pour un total de 32 patients traités ²⁷⁶. Dans cet essai, le MV-NIS se réplique chez les patients avant d'être éliminé par le système immunitaire qu'il attire. De plus, le traitement avec le virus augmente le nombre de lymphocytes T capable de sécréter de l'IFN- γ quand ils sont stimulés par des TAA du myélome multiple ²⁷⁷.

L'innocuité du MV, injecté en intrapéritonéal avec des doses élevées (10^7 à 10^9 virions), a également été mise en évidence dans le traitement de cancers ovariens ²⁷⁸. Les patientes recevant

les plus fortes doses de virus avaient d'ailleurs une durée de vie largement supérieure aux autres après le traitement. Pour la majorité des patientes, la stabilisation de la maladie et l'augmentation de la survie sont corrélées à la qualité de la réponse immunitaire, traduite par la sécrétion d'IFN- γ et d'IL-4, mise en place suite à l'inoculation du virus.

L'induction d'une réponse immunitaire adaptative est également retrouvée dans le lymphome T cutané résistant à la thérapie ou récidivant ²⁷⁹. Dans un essai de phase I, la souche atténuée virale a été administrée à des patients vaccinés contre le MV et préalablement traités avec de l'IFN- α par mesure de sécurité. L'infection a été bien tolérée et cinq des six tumeurs injectées ont régressé ainsi que les tumeurs distantes de deux patients sur les cinq. De la réplication virale a été mise en évidence dans les biopsies ainsi qu'une orientation du phénotype des lymphocytes T vers un phénotype Th1.

Dans ces essais, la réponse antitumorale générée par le MV semble avoir un rôle prépondérant, mais est d'efficacité variable. Pour moduler la réponse immunitaire, un essai clinique en cours ^{NCT04521764; 280} utilise le MV modifié pour exprimer la *neutrophil-activating protein* (NAP), un facteur de virulence d'*Helicobacter pylori*. Cette approche semble induire des réponses Th1 par les lymphocytes T et démontre des effets précliniques prometteurs ²⁸¹⁻²⁸³.

Cependant, la réponse immunitaire peut induire la clairance du virus et limiter son efficacité. Ainsi, dans un essai clinique de phase I pour le traitement du glioblastome, la réplication du MV apparaît comme étant très variable dans les tumeurs de 10 patients traités ²⁴⁷. Cette variabilité est associée au niveau d'activation basale de la réponse IFN-I, plus élevé dans les tumeurs résistantes.

Les mécanismes d'actions précis de la souche vaccinale du MV en immunothérapie oncolytique ne sont pas complètement élucidés. Comprendre les interactions en jeu entre la souche vaccinale du MV, sa réplication dans les cellules tumorales, le microenvironnement tumoral et le système immunitaire inné et adaptatif est l'une des problématiques actuelles de l'immunothérapie médiée par le MV. C'est dans ce cadre que cette thèse a été réalisée afin de déterminer quels sont les freins éventuels de cette approche et de permettre de mieux cibler les patients répondants à cette thérapie.

Tableau 2 | Essais cliniques testant le MV oncolytique

Phase	Virus	Administration	Cancer	Combinaison	Institution	Etat	Référence
I	MV-EZ	Intratumorale	lymphome T cutané	IFN- α	University Hospital Zurich	Terminé	²⁷⁹
I	MV-CEA	Cavité de résection ou intratumorale	Glioblastome	Chirurgie	Mayo Clinic	Terminé	NCT00390299 ²⁸⁴
I	MV-CEA / MV-NIS	Intrapéritonéale	Ovaire		Mayo Clinic	Terminé	NCT00408590 ^{278,284}
I/II	MV-NIS	Intraveineuse	Myélome multiple	Cyclophosphamide	Mayo Clinic	Terminé	NCT00450814 ²⁷⁵⁻²⁷⁷
I	MV-NIS	Intrapleurale	Mésothéliome		Mayo Clinic	Terminé	NCT01503177
I	MV-NIS	Intratumorale	Sein/ Tete et cou		Mayo Clinic	Terminé	NCT01846091
I/II	MV-NIS	Intrapéritonéale	Ovaire		Mayo Clinic	En cours	NCT02068794
II	MV-NIS	Intraveineuse	Myélome multiple	Cyclophosphamide	University of Arkansas	Terminé	NCT02192775
I/II	mix Vaccin	Sous-cutanée	Poumon	avec le traitement standard	Fuda Cancer hospital, Guangzhou	Terminé	NCT02333474
II	MV-NIS	Intrapéritonéale	Ovaire		Mayo Clinic	En cours	NCT02364713
I	MV-NIS	Intratumorale	Gaine du nerf périphérique		Mayo Clinic	En cours	NCT02700230
I	MV-NIS	Intratumorale	Poumon	Atezolizumab	Mayo Clinic	Terminé	NCT02919449
I	MV-NIS	Cavité de résection / liquide céphalo-rachidien après ponction lombaire.	Médulloblastome/ Tumeurs rhabdoïdes atypiques récurrentes	Chirurgie	University of California	Terminé	NCT02962167
I	MV-NIS	Intravésiculaire	Vessie		Vyriad, Mayo Clinic	Terminé	NCT03171493
I	MV-NIS	Intraveineuse	Myélome multiple	F-18 TFB et imagerie	Mayo Clinic	Terminé	NCT03456908
I	MV-s-NAP	Intratumorale	Sein		Mayo Clinic	En cours	NCT04521764

CEA, *carcinoembryogenic antigen* ; EZ, Edmonston-Zagreb ; IFN, interféron ; mix Vaccin : DTP (diphtheria, pertussis, tetanus), BCG (Bacille Camette Guerin), MV, *Serratia*, pneumocoque ; MV, virus de la rougeole ; NIS, symporteur d'iodure de sodium.

OBJECTIFS ET PRINCIPAUX RESULTATS DE LA THESE

Tout récemment, les financements nécessaires à un premier essai clinique de phase I d'immunothérapie par la souche vaccinale du MV en France ont été rassemblés. Cet essai est en cours de préparation et devrait débuter en 2025 à l'institut Gustave Roussy sous la direction du docteur Stéphane Champiat pour le traitement de cinq cancers, dont le mésothéliome. En collaboration avec le docteur Frédéric Tangy de l'institut Pasteur à Paris, notre équipe a caractérisé et breveté le MVΔC qui sera utilisé pour cet essai (Brevet : 10980873) ^{285,286}. La délétion de la protéine C permet à ce virus d'induire davantage d'apoptose des cellules tumorales et conduit à une mort plus immunogène que l'infection avec la souche vaccinale non modifiée. Ce virus est produit par Oncovita, une société fondée en 2015 par Frédéric Tangy et l'ancien directeur de l'équipe, Marc Grégoire. Les travaux de l'équipe caractérisent depuis plusieurs années les propriétés oncolytiques et immunostimulatrices du MV et ont permis de justifier le lancement d'un tel essai clinique.

Les précédentes études de l'équipe ont mis en évidence que la sensibilité des cellules de MPM à l'action oncolytique de la souche vaccinale du MV est due à des défauts de la réponse IFN-I ^{94,142}. Tiphaine Delaunay a montré que le défaut le plus fréquent de la voie IFN-I est une délétion homozygote des gènes codant les cytokines IFNα et IFNβ concomitante à la délétion homozygote du gène suppresseur de tumeur *CDKN2A* situé dans la même région du chromosome 9 ⁹⁴. Son analyse du TCGA révèle que ces délétions sont également retrouvées, dans d'autres types de cancers, dont ceux qui seront traités lors de l'essai clinique. Dans cette étude, une majorité de lignées sensibles au MV ont une cascade de signalisation intacte après IFNAR et l'ajout d'IFN-I exogène inhibe l'action oncolytique du MV.

Les mécanismes qui sous-tendent l'activité oncolytique du MV sont donc bien caractérisés dans les cellules tumorales mais ont peu été étudiés au sein du TME. Pourtant, la présence de cellules non-malignes au sein de la tumeur affecte probablement la réplication du MV. Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse était de caractériser le rôle des cellules dérivées de monocytes, notamment les macrophages de type M2, très présents dans le MPM, sur l'activité oncolytique du MV dans les cellules tumorales. En effet, les cellules non-cancéreuses, comme les monocytes, les macrophages ou les DC, possèdent une voie IFN-I fonctionnelle et, en réponse à la présence du virus, sécrètent de l'IFN-I. Nous avons émis l'hypothèse que cet IFN-I peut se fixer de manière paracrine au récepteur IFNAR des cellules tumorales et ainsi inhiber l'activité oncolytique du MV.

J'ai donc réalisé des cocultures de monocytes issus de donneurs sains différenciés préalablement ou non en macrophages de type M1 et M2 ou en DC avec des cellules de MPM. Dans un premier temps, j'ai montré que quatre jours de coculture orientent les cellules dérivées de

monocytes vers un phénotype de TAM de type M2. Les lignées tumorales utilisées ont deux types de défauts de la réponse IFN-I permettant l'action oncolytique du virus. La lignée Meso13 présente une délétion des gènes IFN-I mais possède une signalisation IFNAR qui est fonctionnelle. La lignée Meso34 est capable de produire de l'IFN-I mais ne possède pas tous les ISG nécessaires à l'inhibition de la réplication virale. J'ai montré que la production d'IFN-I par les cellules dérivées de monocytes permet d'inhiber fortement la réplication virale dans les lignées tumorales ayant une signalisation IFNAR qui est fonctionnelle (comme Meso13). En revanche cette production d'IFN-I n'a pas d'effet notable sur l'action du MV dans les cellules ayant un défaut après IFNAR (comme Meso34).

Lors de ces travaux, j'ai particulièrement caractérisé l'effet de l'infection par le MV des cellules de MPM sur les cellules dérivées de monocytes humains en coculture. J'ai notamment montré que le MV déclenche la transcription de nombreux gènes de l'immunité innée dans les cellules tumorales ainsi que dans les monocytes et les macrophages de type M2. De plus, l'infection par le MV induit la sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires dans les cocultures. De plus, elle induit une augmentation des marqueurs de costimulation et une diminution de marqueurs de l'immunosuppression dans les quatre types de cellules dérivées de monocytes étudiés. Enfin, j'ai montré que le MV induit l'expression de PDL1 sur les cellules tumorales et sur les cellules myéloïdes.

Les résultats obtenus lors de cette étude font l'objet d'un article scientifique dont je suis première auteure qui est actuellement soumis à *Journal of Thoracic Oncology* pour publication.

RÉSULTATS



Oncolytic measles virus induces type I interferon production by tumor associated macrophages and an antiviral proinflammatory microenvironment in mesothelioma

Camille Chatelain^{1,2}, Laurine Berland^{1,2}, Marion Grard^{1,2}, Nicolas Jouand ^{2,3}, Judith Fresquet^{1,2}, Joëlle Nader^{1,2}, Ugo Hirigoyen^{1,2}, Tacien Petithomme^{1,2}, Chantal Combredet⁴, Elvire Pons-Tostivint^{1,2,5}, Delphine Fradin^{1,2}, Lucas Treps^{1,2}, Christophe Blanquart^{1,2}, Nicolas Boisgerault^{1,2}, Frédéric Tangy^{4,6}, Jean-François Fonteneau^{1,2}

¹ Nantes Université, Inserm UMR 1307, CNRS UMR 6075, Université d'Angers, CRCI2NA, F-44000 Nantes, France

² LabEx IGO, Nantes Université, F-44000 Nantes, France

³ Nantes Université, CHU Nantes, CNRS, Inserm, BioCore, US16, SFR Bonamy, F-44000 Nantes, France

⁴ Vaccines Innovation Laboratory, Institut Pasteur, Université de Paris Cité, Paris, France

⁵ Nantes University, Centre Hospitalier Universitaire Nantes, Medical Oncology, F-44000 Nantes, France

⁶ Oncovita, Paris, France

Running title: activation of tumor associated macrophages by oncolytic Measles virus

Keywords: Oncolytic immunotherapy, measles virus, type I interferon, tumor associated macrophages, mesothelioma.

Financial supports: This work was supported by “La Ligue Régionale Grand Ouest contre le Cancer” (CSIRGO: CD16, CD22, CD44, CD49, CD72, CD79 and CD85), “L’association ARSMESO44”, “La Fondation ARC” and “Institut National du Cancer (INCA 2021-070)”. This work was performed in the context of “LabEX IGO program supported by the National Research Agency via the investment of the future program ANR-11-LABX-0016-01”.

Corresponding author: Jean-François FONTENEAU, INSERM UMR1307, CRCI2NA, Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes, 8 quai Moncoussu, BP70721, 44007 Nantes cedex 1, France. Email: jean-francois.fonteneau@inserm.fr

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

ABSTRACT

Attenuated measles virus (MV) exerts its oncolytic activity in malignant pleural mesothelioma (MPM) cells that lack type-I interferon (IFN-I) production or responsiveness. However, other cells in the tumor microenvironment (TME), such as myeloid cells, possess functional antiviral pathways. In this study, we aimed to characterize the interplay between MV and the myeloid cells in human MPM.

We cocultured MPM cell lines with monocytes or macrophages and infected them with MV. We then assessed viral replication and analyzed the transcriptome of each cell type and studied their secretion and phenotypes by high-dimensional flow cytometry.

We show that MPM cells drive the differentiation of monocytes into M2-like macrophages. These macrophages are not permissive for MV replication and inhibit its replication in tumor cells harboring a defect in IFN-I production but a functional signaling after the IFN-I receptor, while having minimal effects on MV replication in tumor cells with defect of responsiveness to IFN-I. Interestingly, inhibition of the IFN-I signaling by ruxolitinib restores MV replication in tumor cells. Upon MV infection, cocultured macrophages express antiviral pro-inflammatory genes and induce the expression of IFN-stimulated genes in tumor cells. MV also increases the expression of HLA and costimulatory molecules on macrophages and their phagocytic activity. Finally, MV induces the secretion of inflammatory cytokines, especially IFN-I, and PD-L1 expression in tumor cells and macrophages.

These results show that macrophages reduce MV replication in some MPM cell lines through their IFN-I production and generate a pro-inflammatory interplay that may stimulate the patient's anti-tumor immune response.

INTRODUCTION

Malignant pleural mesothelioma (MPM) is an aggressive cancer mostly due to asbestos exposure¹. Treatments are mainly based on pemetrexed and cisplatin combination chemotherapy with or without bevacizumab. Unfortunately, the five years survival remains below 10%². In October 2020, an immunotherapy based on an ipilimumab and nivolumab combination has been approved and led to new immunotherapeutic guidelines for MPM³. Benefits of this combination were observed mainly in non-epithelioid mesothelioma patients regardless of PD-L1 expression⁴. However, there is still a large number of patients that do not respond to immunotherapy. In other cancers, poor response to immunotherapy has been linked to a lack of tumor mutational burden and T cell-inflamed gene expression profile in the tumor⁵. In MPM patients, PD-L1 expression is highly variable from one study to another and ranges from 16% to 65% of patients⁶. Furthermore, its expression is more frequent in non-epithelioid mesothelioma and has been associated with a lower overall survival.

The immune infiltrate is highly variable from one MPM patient to another and comprised macrophages, regulatory CD4+ T lymphocytes, CD8+ T lymphocytes and NK cells⁶⁻⁹. Myeloid cells such as tumor-associated macrophages represent the most abundant fraction (30 to 40% of the immune infiltrate) found in almost all tumors. Macrophages are involved very early on in MPM pathogenesis due to dysfunctional phagocytosis of asbestos fibers¹⁰, leading to their activation and to the production of reactive oxygen species that promote both an inflammatory environment and genetic instability¹¹. Later in the disease, they commonly acquire an M2-like phenotype mainly characterized by the expression of CD163 and CD206⁶. Our team previously showed that monocytes cocultured with MPM cell lines differentiate mainly into CD163+ M2-like immunosuppressive macrophages with a central role of M-CSF produced by tumor cells that binds to the CSF1R receptor^{12,13}. Functionally, these M2-like macrophages are able to block the cytotoxicity of tumor antigen specific CD8+ T cells against MPM cells¹³. The first spatial transcriptomics report in MPM shows that M2-like macrophages reside inside the tumor, whereas CD8+ T cells tend to be excluded and accumulate in the adjacent tissue¹⁴. Various strategies aim to attract these cells inside the tumor¹⁵. Other strategies are also being developed to block the immunosuppressive function of M2-like macrophages or to redirect their differentiation toward a more inflammatory, M1-like phenotype¹⁶. Interestingly, in a mesothelioma mouse model, monocytes-derived macrophages accumulate in tumor with an M2-like phenotype and their depletion lead to tumor rejection, in contrary of resident macrophages that support antitumor immune response¹⁷.

Oncolytic immunotherapy is a therapeutic approach based on oncolytic viruses (OVs)¹⁸. OVs are non-pathogenic replicative viruses that infect and kill exclusively or preferentially tumor cells without harming healthy cells. Infection of tumor cells by OVs results in an immunogenic death that can activate antiviral inflammation in ‘cold’ tumors, attract new immune cells and reinforce the antitumor immune response¹⁹. Furthermore, by inserting transgenes into their genome, they can be used as expression vectors to produce therapeutic proteins in the tumor microenvironment (TME). Thus, OVs represent good candidates to attract immune cells in tumors, reorient immunosuppressive myeloid cells, activate the antitumor immune response and enhance immunotherapy by immune checkpoint inhibitors (ICI).

The attenuated vaccine strains of measles virus (MV) are spontaneously oncolytic against numerous types of cancers and have been evaluated in clinical trials²⁰. We and others have shown that MV induces immunogenic death in tumor cells that leads to the maturation of dendritic cells (DC) and promotes tumor antigen cross-presentation²¹⁻²⁴. By studying MV oncolytic activity on a bio-collection of 22 human MPM cell lines, we confirmed that MV oncolytic activity requires CD46 expression on tumor cells²⁵ and that the most permissive tumor cell lines to MV replication present a defective IFN-I response compared to MV-resistant cells^{25,26}. More recently, we showed that the most frequent defect in the IFN-I response found in about 20% of MPM patient is the homozygous deletion (HD) of all IFN-I encoding genes that co-occurs with the HD of *CDKN2A* gene located nearby on the human chromosome 9²⁶.

Interactions between MV and non-malignant cells from the human TME, especially myeloid cells are not well defined but hold great potential for therapeutic development. In this study, we aimed at characterizing these interactions in the context of MPM, with a focus on the myeloid compartment. We cocultured different types of myeloid cells (monocyte, M1- or M2-like macrophages and DC) with two patient-derived MPM cell lines that are permissive to MV replication. First, we confirmed that monocytes differentiate mainly into M2-like macrophages after coculture with MPM cells. Then we showed that myeloid cells, via their production of IFN-I, can decrease MV replication in one of the MPM cell lines. Finally, we showed that MV induces an antiviral proinflammatory response in tumor and myeloid cells that is characterized by the production of numerous chemokines and cytokines, as well as PD-L1 expression on both cell types. These results suggest that MV may be a good candidate to modify the MPM TME and thus make it more favorable to the efficacy of both the anti-tumor immune response and ICI immunotherapy.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines

Human MPM cell lines were established and genetically characterized in the laboratory from pleural effusions (Biocollection DC-2011-1399, CHU Nantes, France) ²⁷. The cell lines were cultured at 37°C and 5% CO₂ in Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)-1640 (Eurobio) supplemented with 2mM L-Glutamine, 100IU/mL Penicillin, 100µg/mL Streptomycin (all from Gibco), and 10% heat-inactivated Fetal Calf Serum (FCS, Corning). They were regularly screened for Mycoplasma contamination (PlasmoTest™, InvivoGen).

Monocyte purification and myeloid cell differentiation

Blood monocytes were isolated through negative magnetic sorting (EasySep Human Monocyte Enrichment Kit, StemCell) from peripheral blood mononuclear cells of healthy donors (Etablissement Français du Sang, ethics agreement CPDL-PLER-2022 09).

Macrophages were differentiated from monocytes over 4 days, seeded in a 12-well plate at 1.10^6 cells in 1mL of RPMI supplemented as described. At the seeding day and the day after, 200U/mL of GM-CSF (Miltenyi) was added to differentiate M1-like macrophages or 5000U/mL of M-CSF (Miltenyi) for M2-like macrophages. After 4 days, macrophages were harvested for experiments. DCs were differentiated from monocytes over 5 days, seeded at 10.10^6 cells in a 6-well plate with 5 mL of RPMI supplemented with 100U/mL Penicillin, 100µg/mL Streptomycin, 2mM L-Glutamine, 2% human albumin (VIALEBEX), 1000IU/mL of GM-CSF and 200IU/mL of Interleukin-4 (Miltenyi). After 5 days, DCs were harvested for experiments.

Oncolytic measles virus and infection of cocultures

The live-attenuated Schwarz strain of measles virus (MV) and MV expressing the enhanced green fluorescent protein (MV-GFP) were produced as previously described ²⁸.

Myeloid cells were cocultured with MPM cells at a 1:2 myeloid:MPM cell ratio, in 50% supplemented RPMI and 50% conditioned medium from MPM cells. In parallel, each cell type was cultured alone following the same procedure. After 24h, cells were infected with a multiplicity of infection of 1 viral particle per MPM cell. All experiments were conducted 72h after infection.

Immune profiling of samples by high-dimensional flow cytometry

Cells were infected with MV-GFP. A total of 300,000 cells per condition were harvested using tryPLE (GIBCO). After washing in Phosphate buffered saline (PBS), the cells were incubated

20 minutes with 1:500 Zombie UV™ Fixable Viability dye (Biolegend) in PBS. They were washed with PBS-0.1% Bovine Serum Albumine (BSA, Sigma-Aldrich) and fixed with PBS-4% paraformaldehyde (PFA, Electron Microscopy Sciences) for 10 minutes, washed and stored at 4°C.

Cells were incubated in 50µL of Brilliant Stain Buffer (BD Biosciences) supplemented with 1.25µg of human BD Fc Block (BD Biosciences) and 1.25µg of True Stain monocytes blocker (Biolegend). After 10 minutes, appropriate concentrations of specific antibodies or isotype controls from the same manufacturer were added for 30 min at 4°C (available in supplemental table 1 (Table S1)).

After three washes in PBS-0.1%BSA, stained cells were acquired on a 5 laser, 32 detector BD FACSymphony™ A5 Cell Analyzer (BD Bioscience). The BD FACSDiva 8.0 software (BD Biosciences) was used for data acquisition. Weekly QC was performed using CS&T DiVa QC beads (BD Biosciences), and standardization of the flow cytometry data acquisition across the three independent experiments was done using Rainbow Calibration Particles (8 peaks) (BD Biosciences), to ensure that the instrument variability was inferior to 3% for each detector.

Flow cytometry supervised and unsupervised analysis

Flow cytometry data were cleaned using the FlowAI algorithm with default settings on the OMIQ platform (Dotmatics, <https://www.omiq.ai/>)²⁹. Cells were manually gated to remove aggregates, debris and doublets. Compensations were performed, checked and applied to samples using FlowJo software 10.8.1 (BD Biosciences). Arcsinh scaling was adjusted in OMIQ to ensure than 99% of events were on scale and the negative population was unimodal around 0 for each channel. The gating strategy for further analysis on live cells is shown in supplemental figure 1 (Figure S1).

The FlowSOM algorithm was applied to 7,000 events for each sample (Euclidean distance to determine the nearest neighbor of a new point, 7×7 grid for the self-organizing map, 10 training iterations) to cluster the data³⁰. Results were mapped on a UMAP dimensional reduction of all fluorescent features, excluding GFP and the viability dye³¹.

Cells positive for HLA-DR and CD45 were gated and downsampled to 1,200 events. The FlowSOM algorithm was applied to uninfected samples with the same settings as before. Twelve homogeneous metaclusters were identified and visualized on an Opt-SNE dimensional reduction of all features excluding GFP and the viability dye³². Metaclusters were annotated to display the different conditions of cultures. The MFI values of markers were displayed on a clustered heatmap, normalized by column. A principal component analysis was performed on all features

except for GFP and viability dye to show the variations between the different culture conditions³³. The FlowSOM algorithm, with the same settings, was also applied on all samples. Twenty metaclusters were created and annotated to display the different culture conditions and visualized on an Opt-SNE dimensional reduction of all fluorescent parameters except for the viability dye. Cocultured samples were then grouped into 4 culture conditions and the MFI values of markers were compared. The MPM cells (HLA-DR or CD45 negative cells) were analyzed for the MFI of GFP and PD-L1.

MV replication assay

10,000 MPM cells were seeded in 96-well plates in 180µL of their culture medium, alone or with 5,000 monocytes, M1-like or M2-like macrophages. After 24h, they were infected or not with MV-GFP. Viral replication was monitored for 10 days by measuring GFP fluorescence daily using a FLUOstar Omega reader (BMG Labtech). Data were normalized to the uninfected conditions and compared between cocultured cells and MPM cells alone.

Confocal microscopy

Cocultures were seeded in µ-Slide 8-well plates (IBIDI) with 30,000 MPM cells/well. Treatment with 2µM Ruxolitinib (Invivogen) or 1,000IU/mL of IFN-α2a/-β1 (Immunotools) was administered or not 8h prior to MV-GFP infection. Cells were fixed in PBS-4% PFA at room temperature for 10 minutes. Myeloid cells were stained overnight with an anti-CD45-APC antibody (Biolegend, RRID:AB_304037) diluted to 1:50 in PBS-2% BSA. Nuclei were labelled with 5µg/ml of Hoechst33342 (Sigma) in PBS-2% BSA for 1h.

Pictures were taken with a Nikon A1rHD LFOV confocal microscope, with a 60x oil immersion objective (Nikon Instruments). The images were processed and analyzed using the ImageJ software³⁴.

mRNA extraction for 3'RNAseq digital gene expression and RT-PCR

Cells in cocultures with monocytes or M2-like macrophages, infected with MV or not, were harvested using TryPLE. CD45+ and CD45- cells were sorted using human CD45 (TIL) MicroBeads (Miltenyi). An additional 4mL wash step was added to the manufacturer's protocol. RNAs were extracted immediately from positive and negative cells using Nucleospin® RNA plus kit (Macherey-Nagel).

3'RNAseq digital gene expression

mRNA were analyzed by 3'seq-RNA Profiling (GenoBird, IRS-UN, Nantes, France) using a NovaSeq 6000 (Illumina) as described previously ³⁵. The quality of raw sequence reads was assessed by FastQC. Adapter sequences were trimmed off the raw sequence reads using Cutadapt. Reads were aligned to the human (hg38) genome using BWA. Differential expressions were detected using the BIOMEX software ³⁶.

We identified the KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathways involving the differentially expressed RNA using PathfindR ³⁷ and conducted further analysis with R 2023.03.0.

Reverse-transcriptase quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

1µg of RNA was reversed-transcribed (Invitrogen). Quantitative PCR was performed on a QuantStudio3 system (Applied) using Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master mix (Thermo Scientific). Each reaction was done in duplicate. Melting curve analysis was performed to ensure specificity of the amplification. Gene expression was normalized based on the expression of the housekeeping gene encoding the Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0 (RPLP0). Primers used are available in table S2.

Chemokine detection by multiplex assay

The supernatants of cocultures were collected after 72h of infection with MV for IL-1β, IL-6, CXCL8, IFN-α2, IFN-β, IFN-λ1, IFN-λ2/3, IFN-γ, TNF-α, CXCL10, GM-CSF quantification using the LEGENDplex™ Human Anti-Virus Response Panel (BioLegend) according to the manufacturer's recommendations.

Statistical analysis

Data are presented as the mean +/- SEM between biological replicates. Statistical details and the number of biological replicates (n) are displayed in the figure legends. Means of two groups were compared using the non-parametric Mann-Whitney test. Means of more than two groups were compared with Kruskal-Wallis test. Statistical analysis were conducted using GraphPad Prism.

RESULTS

Monocytes cocultured with MPM cell lines differentiate into CD1c-CD206+CD163+ M2-like macrophages.

In a first experiment, we sought to characterize the effect of MPM tumor cells on the phenotype of different subsets of myeloid cells. As myeloid cells, we used monocytes either undifferentiated or differentiated with GM-CSF/IL-4 to obtain dendritic cells (DC), or with GM-CSF or M-CSF to obtain M1-like or M2-like macrophages respectively (hereafter coined as M1 or M2 macrophages). These myeloid cells were cultured alone as control, or cocultured with Meso13 or Meso34 MPM cell lines at a 1:2 (myeloid:MPM) cell ratio (Figure 1A). We then analyzed their phenotypes with high-dimensional flow cytometry using 13 discriminating markers. Our gating strategies and analysis pipeline are shown in Figure S1. After 4 days with MPM cells, we found that the average frequency of CD45+HLA-DR+ cells accounted for 6 to 12% of total viable cells and displayed phenotypes distinct from MPM cells (Figure 1B-C). CD45+HLA-DR+ myeloid cells of all donors were grouped into 12 different metaclusters based on their markers expression (Figures 1D-1F). To assess the impact of MPM on the myeloid compartment, both control myeloid cells and myeloid + MPM cocultures were visualized on the same high-dimensional representation (Figure 1D). A small cluster of 172 cells (MC3) was found only in cocultures with Meso13 cells and expressed low level of CD45 suggesting it was tumor cells. We removed it from subsequent analysis.

We further annotated the 11 metaclusters based on their relative cell abundance of each culture condition, with monocultures hereafter coined as control (Figures 1E-1F). Control monocytes were found in MC1 and MC2 and were CD14^{low}CD1c-CD206-CD163-. Control DC were found in MC8 and MC9 and were CD1c^{high} CD206^{low}CD163-. Control M1 were in MC6 and MC7 and were CD1c^{high}CD206^{high} CD163^{low}. Control M2 were mostly found in MC4 and were CD1c- CD206^{int}CD163^{high}. Upon coculture with MPM, 95.6% of the myeloid cells were present in 5 main clusters (namely MC4, MC5, MC10, MC11, and MC12). Most cocultured monocytes (86,7%) were found into MC4 and MC12 clusters and displayed an M2-like phenotype (CD1c- CD206^{int}CD163^{high}). Cocultured DCs or M1 were enriched in 3 clusters (MC5, MC10 and MC11) and were annotated as one group since they expressed similar markers. They tend to lose CD1c expression and gain CD163 expression suggesting a phenotypic conversion towards the M2-like phenotype (Figure 1F). Interestingly enough, cocultured M2 were in the same cluster (MC4) as the M2 control monoculture, but also appeared in a new cluster (MC12) characterized by the overexpression of many markers (CD45, HLA-DR, CD86, CD206, CD68, CD14 and CD16) (Figures 1E-1F). Finally, a principal component analysis highlights that regardless of their initial phenotype, myeloid cells cultured with MPM tend to differentiate towards an M2-like state (Figure 1G), confirming our previous observations¹³. Subsequent analyses from our study thus focus on monocytes and M2 cocultured with MPM cells.

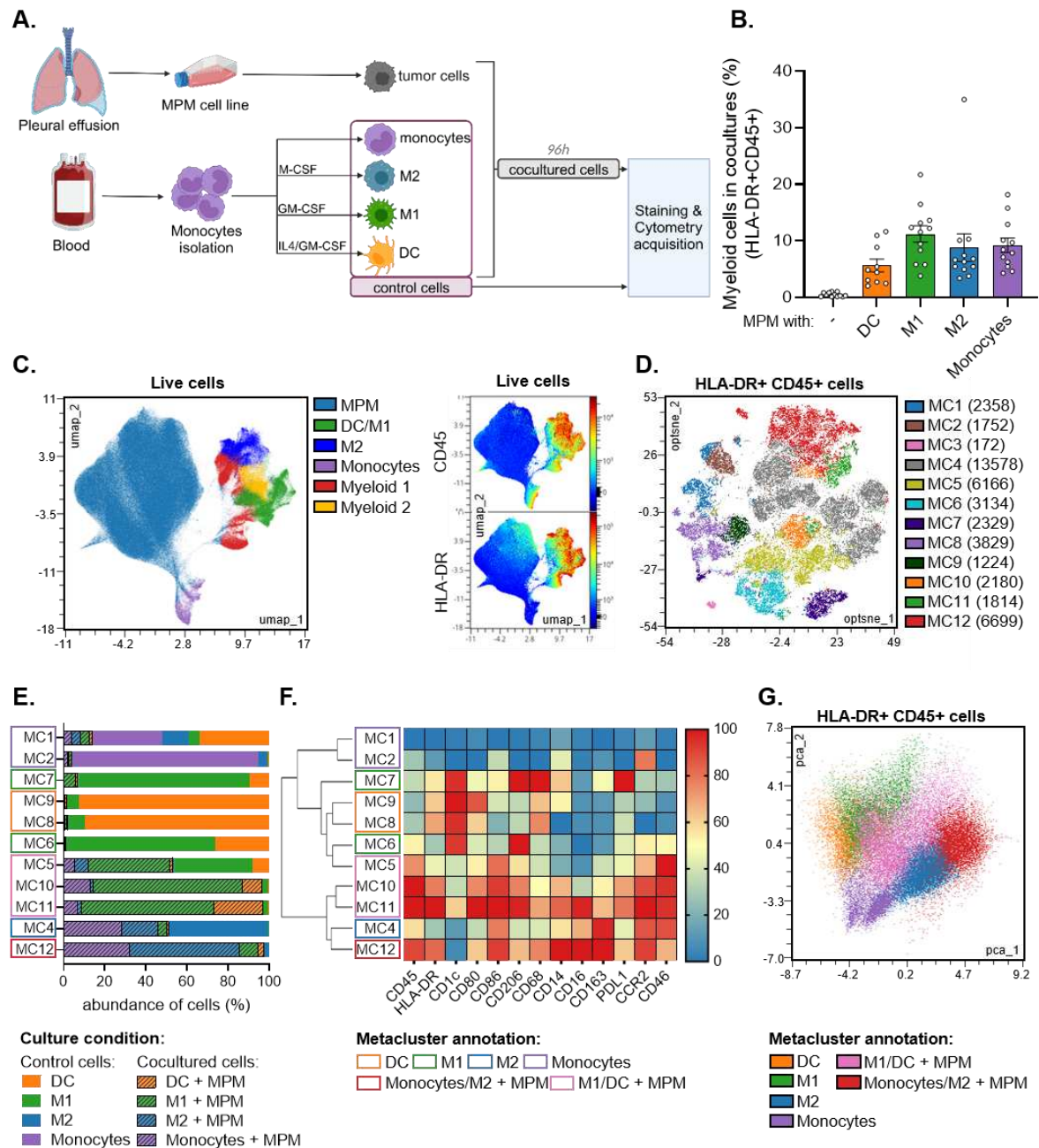


Figure 1 | MPM cells orient myeloid cells towards an immunosuppressive phenotype. Myeloid cells were cultured alone or with MPM cells for 96h. They were then analyzed by flow cytometry for the expression of 13 markers. (A) Experimental design. (B) Proportion of myeloid cells (HLADR+CD45+) in cocultures with MPM cells (n=5 donors for monocytes and DC, n=6 donors for M1 and M2, 2 MPM cell lines). (C) FlowSOM clustering was performed on live cells (n=5 donors for monocytes and DC, n=6 donors for M1 and M2, 2 MPM cell lines). Metaclusters are shown on a UMAP dimensional reduction. (D) FlowSOM clustering was performed on HLA-DR+CD45+cells. Metaclusters are shown on the Opt-SNE dimensional reduction. The number of cells for each metacluster is shown in brackets. (E) The abundance of each culture type in metaclusters was assessed. Groups of metaclusters were annotated with wide shapes. (F) The median of fluorescence intensity (MFI) of each marker on the different metaclusters is normalized by column. (G) Principal component analysis was performed on the

← previously annotated metaclusters. DC, dendritic cell; GM-CSF, Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor; IL4, interleukin 4; M1, M1-like macrophage; M2, M2-like macrophage; MC, metacluster; M-CSF, Macrophage Colony-Stimulating Factor; MPM, Malignant Pleural Mesothelioma.

Myeloid cells reduce MV replication in MPM tumor cells exhibiting an IFN-I production defect

We previously showed *in vitro* that the spontaneous oncolytic activity of the Schwarz attenuated strain of MV is directed against human MPM cell lines with defects of the antiviral IFN-I response²⁵. We found two types of defects that lead to permissiveness of tumor cells to MV replication. On the one hand, some MPM cell lines such as Meso34 are able to produce IFN-I (IFN- α and - β) in response to MV but failed to control MV replication. On the other hand, some MPM cell lines, like Meso13, are unable to produce IFN-I in response to MV and therefore are unable to inhibit MV replication²⁶.

In a first set of experiments, we determined whether monocytes, M1, M2 or DC cocultured with Meso13 or Meso34 could affect MV replication in tumor cells. Thereafter, cocultures were exposed to MV encoding the green fluorescent protein (MV-GFP) and three days later we measured GFP expression by flow cytometry as a readout of MV replication in MPM cells (Figures 2A-2B). After 72h of MV infection, we found that coculture with CD45+ myeloid cells reduces GFP expression in Meso13, especially with M2 macrophages that inhibit 90,3% of GFP fluorescence in tumor cells. On the other hand, coculture with CD45+ myeloid cells does not affect GFP expression in Meso34.

We then measured the kinetics of GFP expression over 10 days after infection in absence or in presence of ruxolitinib, a JAK1/2 inhibitor that blocks IFNAR signaling (Figure 2C-2D). We observed that myeloid cells decrease significantly MV replication in Meso13 and that addition of ruxolitinib restores it. In Meso34, MV replication is not significantly affected and addition of ruxolitinib tends to increase it. These results suggest that myeloid cells inhibit MV replication in Meso13 through IFN-I production.

We then followed MV replication in MPM tumor cells cocultured or not with myeloid cells by confocal microscopy. After 72h of MV infection, we observed that myeloid cells or IFN-I stimulation reduces GFP fluorescence in Meso13 but that the fluorescence can be restored by ruxolitinib (Figure 2E). In Meso34, addition of myeloid cells or IFN-I did not affect GFP fluorescence, while ruxolitinib increased it. Altogether these results show that myeloid cells tend to inhibit MV replication in Meso13, whereas they have a smaller effect on MV replication in Meso34.

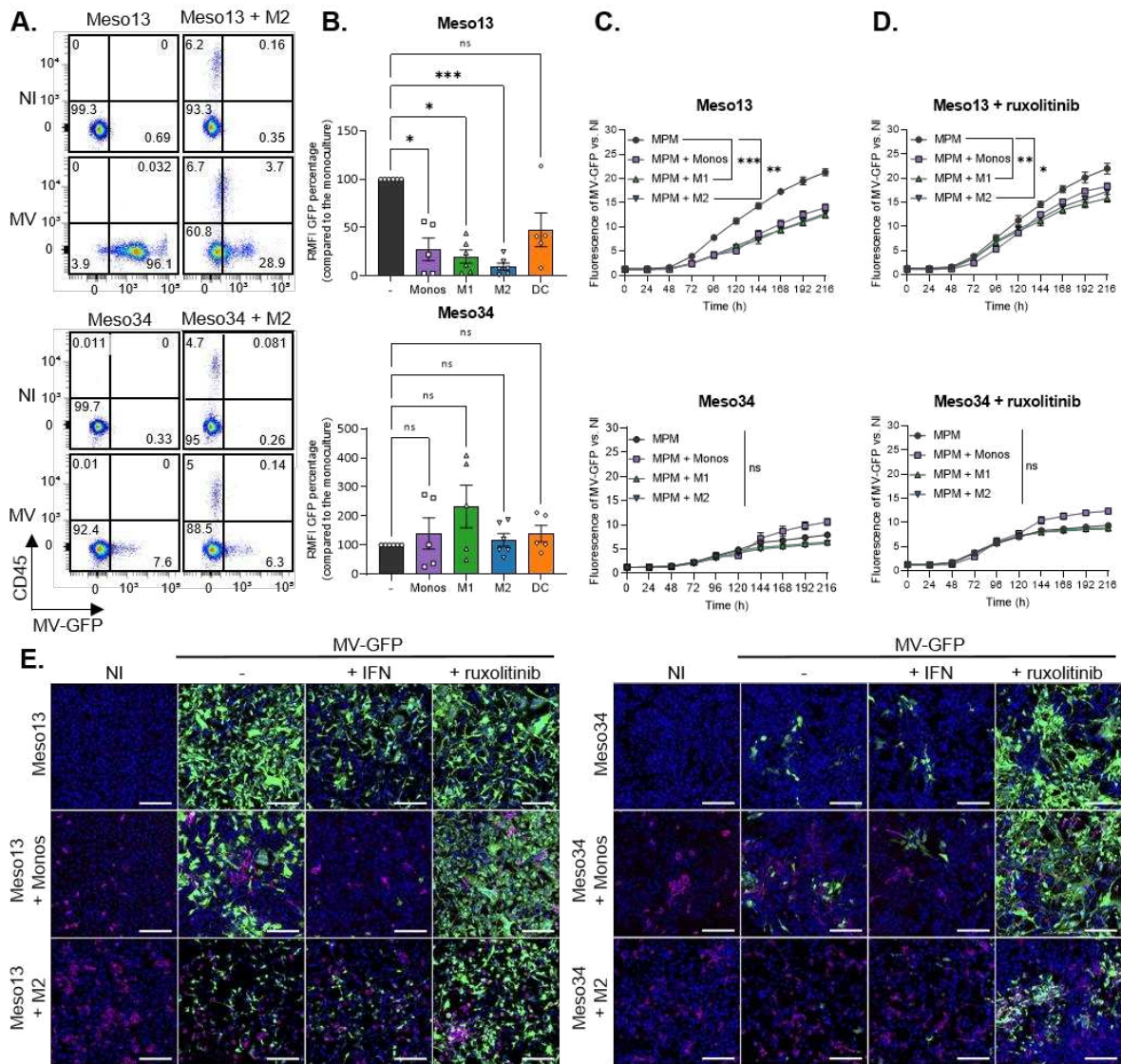


Figure 2 | Myeloid cells reduce MV replication in MPM cells without IFN genes. Two MPM cell lines, Meso13 or Meso34, were cultured either alone or with myeloid cells. IFN-  genes are deleted in Meso13. Meso34 has probably a defect in ISG production. Cells were infected with MV-GFP at MOI=1. (A, B) After 72h, cells were stained as in Figure 1. (B) MV-GFP relative MFI (RMFI) corresponds to the MFI ratio of MV-GFP infected over uninfected MPM cells (HLA-DR or CD45 negative cells). Data are presented as percentage of the RMFI of MPM cells in monocultures (n=6 donors, Kruskal-Wallis test). (C-D) Cocultures were treated or not with ruxolitinib, an inhibitor of IFNAR signaling, and MV-GFP fluorescence was measured for 10 days (n=4 donors, Kruskal-Wallis test). (E) Cultures were treated with ruxolitinib or IFN- . Nuclei were labelled with Hoechst (blue), myeloid cells were stained with anti-CD45 antibody (red) and GFP from MV replication appears in green. Fluorescence was observed by confocal microscopy (representative images of 6 donors, scale bar = 200  m). DC, dendritic cell; IFN, Interferon; ISG, Interferon stimulated genes; M1, M1-like macrophage; M2, M2-like macrophage; MOI, multiplicity of infection; Monos, Monocytes; MPM, Malignant Pleural Mesothelioma; MV, Infected with MV; NI, Uninfected. ns, non-significant, * p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.001.

When we measured GFP fluorescence in Meso13 cocultured with M2 cells exposed to MV-GFP, we observed a small increase of GFP expression in all the CD45+ cells (Figure 2A). This GFP fluorescence in macrophages is either due to residual MV replication or to acquisition by phagocytosis of GFP produced by MV-GFP-infected Meso13 tumor cells. Thus, we performed experiments to clarify the source of this GFP (Figure S2). We cultured M2 macrophages alone and infected them with MV-GFP. After 3 days, we observed no fluorescence in these cells. We also cocultured M2 macrophages with Meso13 expressing constitutively the GFP. Three days after MV infection, we observed that M2 macrophages were GFP positive in similarly to what we observed in figure 2A. These results suggest then that M2 macrophages are not permissive to MV replication and that upon MV infection of Meso13, macrophages may phagocyte GFP-containing cell debris.

MV induces antiviral inflammatory response in myeloid cells cocultured with MPM tumor cells.

To understand how cocultures with infected MPM cells impact monocytes and M2 function, we analyzed their transcriptomic program by 3'RNA sequencing after magnetic sorting of cells based on their CD45 expression. We first observed that MV has a more profound transcriptomic impact in M2 than in monocytes cocultured with MPM cell lines (4472 *versus* 150 significantly deregulated genes, respectively) (Figure 3A). Analysis of the 25 most deregulated pathways by MV in cocultured monocytes or M2 showed that MV impacts mainly pro-inflammatory anti-viral pathways such as IFN-I, TNF, IL-17 and necroptosis pathways (Figure 3B, Table S3-S4). In M2 macrophages from MPM cocultures, we also found a deregulation of pathways associated with antigen presentation such as “cell adhesion”, “phagosome” and “antigen processing and presentation”. As expected, among the 100 most deregulated genes, we found that MV induces expression of the *IFNB1* gene (coding for IFN- β) in monocytes or M2 cocultured with MPM, and several genes encoding IFN- α in monocytes cocultured with Meso13 (Figure 3C). MV infection also activates *IFNL1* expression that encodes IL-29 also called IFN- λ 1, a type III interferon. As a consequence, MV activates expression of several interferon stimulated genes (ISG) in myeloid cells such as *APOBEC3A*, *APOBEC3H*, *IFIH1/T1/T2/T3/TM1*, *ISG15*, *ISG20* and *MX1*. Furthermore, infection induces the expression of numerous chemokine genes such as *CCL3*, -4, -4L1, -5, -7, -8, and *CCXCL-8*, -10, -11, and some chemokine receptors such as *CCR3* and *CCR7*. We also observed that the expression of some genes is repressed by the virus, such as *MRC1* that encodes CD206. Finally, we confirmed and validated by RT-qPCR the expression of four genes of interest *CLEC5A*, *MRC1*, *CCR7* and *TAP1* (Figure 3D). Thus, MV induces an antiviral pro-inflammatory response in M2-like macrophages that were cocultured with MPM cells.

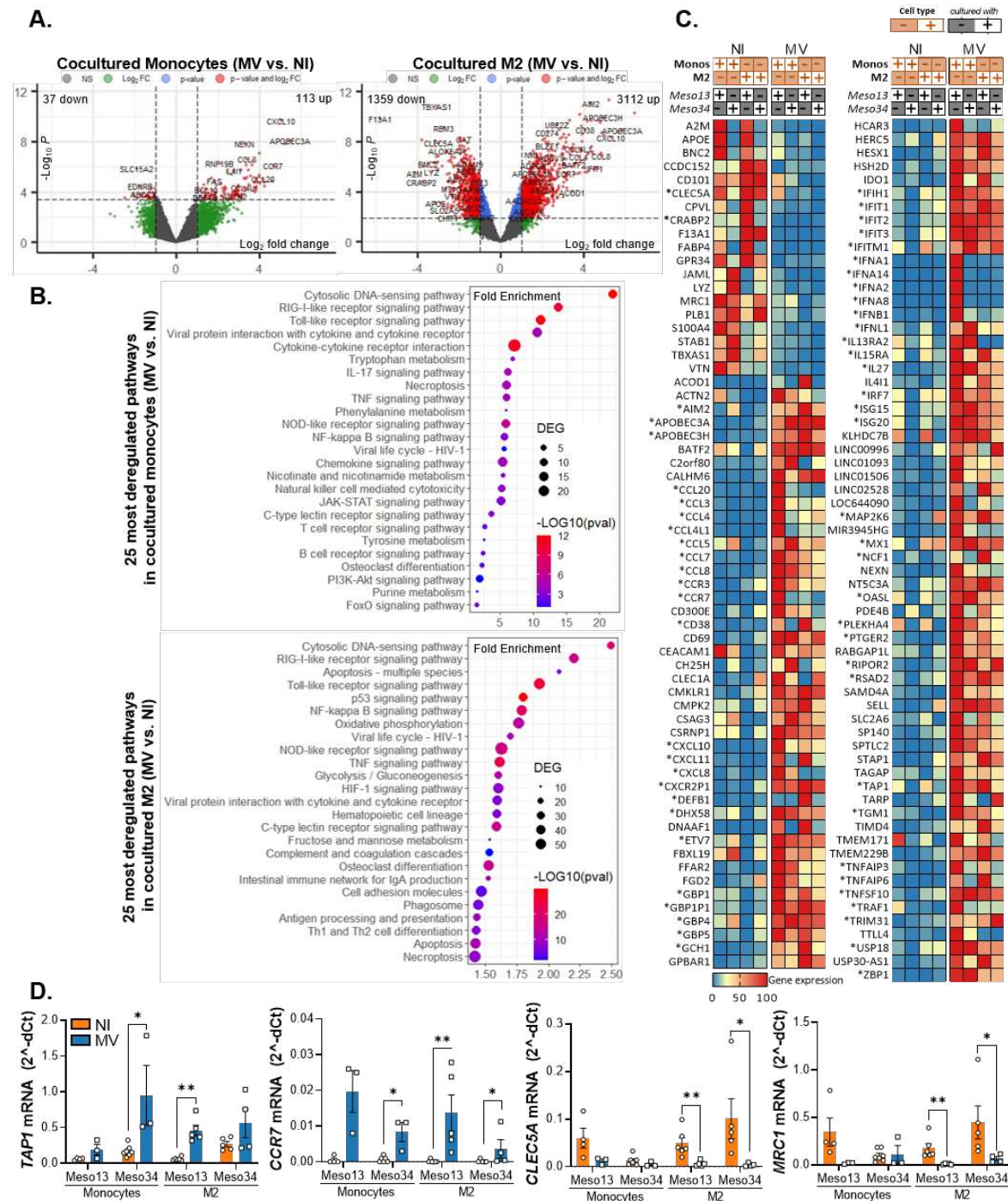


Figure 3 | MV induces the expression of antiviral pro-inflammatory pathways in myeloid cells. Meso13 and Meso34 were cultured with monocytes or M2. After 24h, MPM cells were infected or not with MV at MOI=1. After 72h of infection, cells in cocultures were sorted according to CD45 expression. (A-C) A 3'RNA sequencing was performed on each cell type. Gene expression volcano plot (A) the 25 most deregulated pathways (B) or the 100 most deregulated genes in M2 and the 100 most deregulated genes in monocytes (C) upon infection in myeloid (CD45+) cells cocultured with MPM cells are shown. The heatmap is normalized by line. (D) Expression of key markers in myeloid cells was assessed by qPCR (n=4 to 6 donors, Mann-Whitney test, *p<0.05, **p<0.001).

  M2, M2-like macrophage; MOI, multiplicity of infection; Monos, Monocytes; MPM, Malignant Pleural Mesothelioma; MV, Infected with MV; NI, Uninfected.

MV induces antiviral inflammatory response in MPM cells cocultured with myeloid cells.

In the same transcriptomic experiment, we also analyzed the transcriptomic program of CD45- MPM cells cocultured with monocytes or M2 exposed or not to MV. Infection by MV modulates the expression of thousands of genes in Meso13 and Meso34 cocultured with monocytes or M2 (Figure 4A). MV impacts pro-inflammatory anti-viral pathways in cocultured tumor cells such as the IFN-I, the TNF and IL-17 pathways (Figure 4B, Table S5-S6). It also impacts pathways implicated in cell death such as pyroptosis, autophagy and apoptosis, and activation of several metabolic pathways. As expected, we found that MV induces the expression of the *IFNB1* gene only in Meso34 cocultured with monocytes or M2 as expected, since Meso13 has lost both copies of this gene (Figure 4C). MV activates lots of ISGs in cocultured Meso13 and Meso34 such as *RSAD2*, *MX1/2*, *OASs* and *IFITs* genes. When we compared ISGs induced in mesothelioma and in myeloid cells, we observed that each cell type has its own ISG profile (Figure S3). Furthermore, MV induced the expression of numerous cytokines such as *IL-1A*, *IL-1B* and *IL-6* and chemokine genes such as *CCL3*, *-4*, *-4L1*, *-4L2*, *-5*, *-20* and *CCXCL-2*, *-3*, *-5*, *-8*, *-10* and *-11*. We also found that the expression of some genes is repressed by the virus, with a stronger decrease in Meso13. These genes belong mainly to the metabolism of steroid hormones and the extracellular matrix proteoglycan pathways.

In this transcriptomic analysis, we observed in cocultured Meso13 the expression of some ISGs such as *STAT1*, *MX1* and *TLR3* whose expression requires IFN-I. However, Meso13 does not express IFN-I genes (Figure 4C). Thus, the expression of *STAT1*, *MX1* and *TLR3* was probably induced by IFN-I secreted from myeloid cells. We confirmed this hypothesis by comparing the expression of these ISG in MPM cells cultured alone *versus* MPM cells cultured with myeloid cells (Figure 4D). We observed an increased expression of *STAT1*, *MX1* and *TLR3* expressions in response to MV, only when Meso13 was cocultured with myeloid cells or exposed to IFN-I.

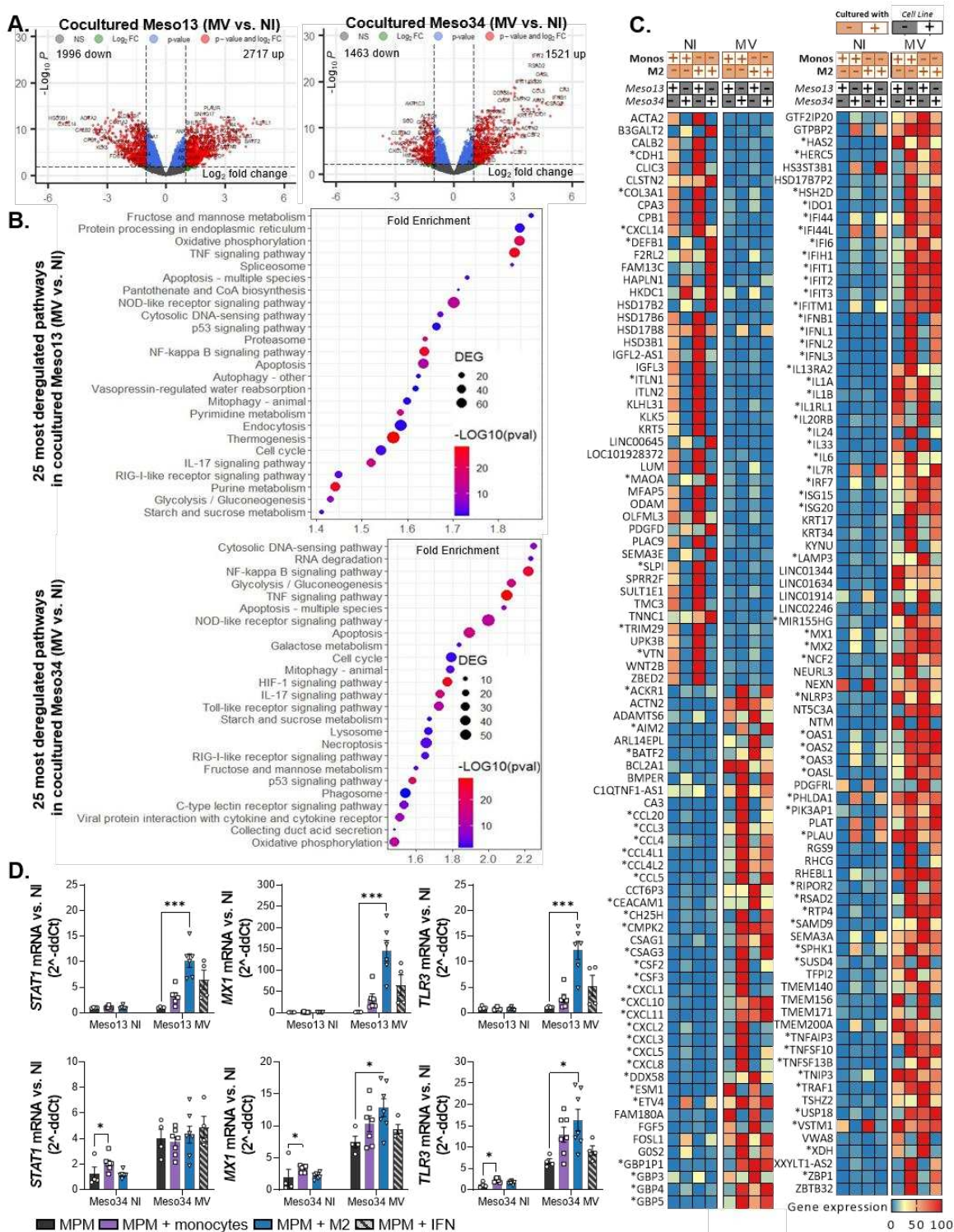


Figure 4| Upon infection, myeloid cells induce the expression of ISG in MPM cells. Meso13 and Meso34 were cultured with monocytes or M2. After 24h, MPM cells were infected or not with MV at MOI=1. After 72h of infection, tumor cells in cocultures were negatively sorted according to CD45 expression. (A-C) A 3'RNA sequencing was performed on each cell type. Gene expression volcano plot (A), the 25 most deregulated pathways (B), or the 100 most deregulated genes (C) upon infection in MPM cells cocultured with myeloid (CD45+) cells are shown. The heatmap is normalized by line. (D) Expression of three ISG, strictly dependent of IFN-I, were assessed in tumor cells cultured alone or with myeloid cells by qPCR (n=4 to 6 donors, Kruskal-Wallis

← test, *p<0.05, ***p< 0.001). IFN, interferon; ISG, Interferon stimulated genes; M2-like macrophage; MOI, multiplicity of infection; Monos, Monocytes; MPM, Malignant Pleural Mesothelioma; MV, Infected with MV; NI, Uninfected.

MV promotes a pro-inflammatory secretome and modulates surface markers expression in myeloid cells cocultured with MPM tumor cells

We found that MV activates the expression of genes encoding cytokines and chemokines in cocultured myeloid cells and MPM cell lines. We next measured secretion of some of these cytokines and chemokines in the supernatants of tumor cells cultured alone or cocultured with monocytes or M2 and infected with MV (Figure 5A). As expected and observed in the transcriptomic analysis, Meso13 cells was unable to produce IFN- β 1 or IFN- α 2 in response to MV, but these two cytokines were produced in the supernatants when myeloid cells were present in the coculture. On the other hand, Meso34 cells was able to produce IFN-I in response to MV and more IFN- γ 2 was measured in the supernatants when myeloid cells were present. We also observed an increase of IFN-III (IFN- λ 1 and - λ 2/3) production in response to MV when myeloid cells were present. IL-6 and IL-1- β secretions were also induced by MV in tumor cells and in myeloid cells. Other cytokines like TNF- α or CXCL10 were found in higher amounts in the supernatants of cocultured myeloid and MPM cells than in those of MPM cells cultured alone. We also observed that in response to MV, Meso13 and Meso34 produced GM-CSF that is probably consumed by myeloid cells, since this cytokine was not found in the supernatants when myeloid cells were present. These results confirm that myeloid cells cocultured with MPM cells are activated by MV and produce numerous cytokines and chemokines, in particular IFN-I.

To investigate the phenotypic changes induced by MV on myeloid and tumor cells of the coculture, we used the 13 fluorescence-conjugated antibody panel against different markers. After metaclustering of control cells and cocultured cells, we annotated the metaclusters with the different condition of cultures, following a similar strategy as in Figure 1 (Figure 5B, Figure S1E, Figure S4). We observed a phenotypic shift induced by MV-GFP for all types of myeloid cells cocultured with MPM cells (Figure 5C). This phenotypic shift was characterized by an increase of CD86 and PD-L1 expression in all types of myeloid cells (Figure 5D). The myeloid cells also acquire a slight GFP fluorescence that is probably due to phagocytosis as demonstrated earlier. We also observed an increase of HLA-DR and CD80 expression induced by MV that is significant only for M2 and M1, respectively. CD163 expression is decreased by MV on M2 that had been cocultured with MPM cells. Finally, MV also induced the expression of PD-L1 on Meso34 MPM cells (Figure 5E), whereas it did not modify the already high expression of PD-L1 on Meso13 (Figure S5).

Altogether, these results confirm at the protein level the activation of an antiviral inflammatory response in myeloid cells cocultured with MPM cells, leading to the expression of the immunosuppressive protein PD-L1 on tumor and myeloid cells.

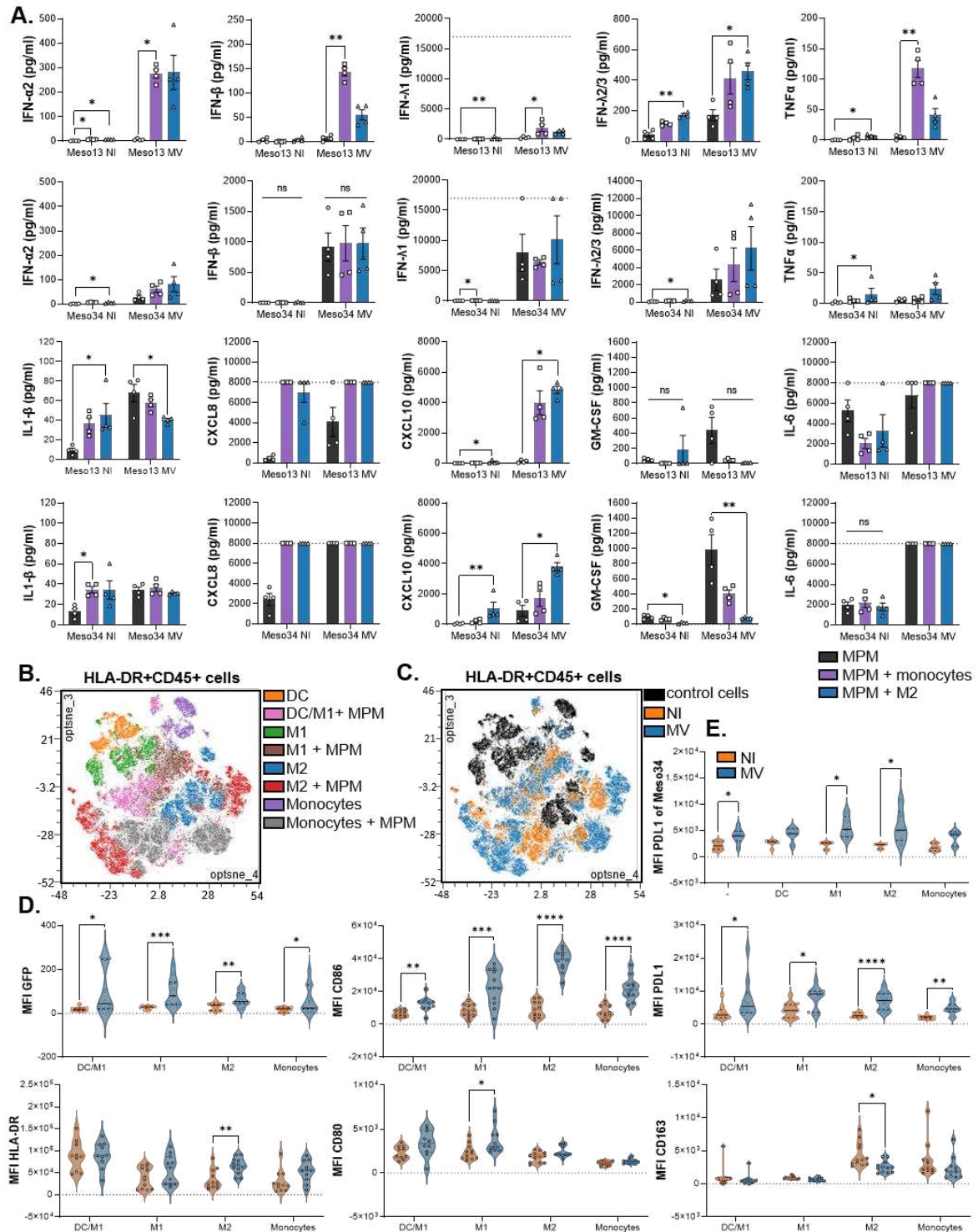


Figure 5 | MV oncolytic action induces pro-inflammatory proteins expression in myeloid cells. (legend next page)

← MPM cells were cultured alone or with myeloid cells for 96h. After 24h, some of the cocultures were infected with MV at MOI=1. (A) Cytokine secretion was measured in culture supernatants (n=4 donors, Kruskal-Wallis test). (B-E) Myeloid cells were cultured alone or with MPM cells. Some of the cocultures were infected at 24h with MV-GFP. They were analyzed at 96h by flow cytometry for the expression of 13 markers. After gating of HLA-DR+CD45+ cells, FlowSOM clustering was performed on cells control and cells cocultured with infected or uninfected MPM cells (n=5 donors for monocytes and DC, n=6 donors for M1 and M2, 2 MPM cell lines). (B) Annotations of metaclusters are shown on an Opt-SNE dimensional reduction. (C) Culture conditions (HLA-DR+CD45+ cells: control, cultured with non-infected MPM cells, cultured with MV MPM cells) are shown on an Opt-SNE dimensional reduction. (D) Expression of immune-related molecules on HLA-DR+CD45+cells, annotated in B, cocultured with infected (blue) or uninfected (orange) MPM cells (Mann-Whitney test). (E) Expression of PDL1 on Meso34 infected or not, cocultured with myeloid cells (Mann-Whitney test). DC, dendritic cell; M1, M1-like macrophage; M2, M2-like macrophage; MFI, median of fluorescence; MOI, multiplicity of infection; MPM, Malignant Pleural Mesothelioma; MV, Infected with MV; NI, Uninfected. ns, non-significant, *p<0.05, **p< 0.001, ***p< 0.001.

DISCUSSION

In this study, we confirmed that MPM cells drive monocytes, and to a lesser extent M1 and DCs, towards an M2-like phenotype. We then showed that MV is able to activate an inflammatory response in cocultured myeloid and tumor cells characterized by the expression of a large panel of ISGs and the secretion of numerous cytokines and chemokines. Importantly, MV induces PD-L1 expression not only on tumor cells, but also on myeloid cells. In return, the inflammatory response of myeloid cells decreases MV replication in tumor cells, especially in those that are unable to produce IFN-I in response to the virus. Despite the impairment of MV replication, our results suggest that oncolytic MV may be able to attenuate the TME immunosuppressive properties by shifting tumor-associated myeloid cells toward a more favorable phenotype.

We showed that, when in contact with MPM cells, monocytes differentiate towards an M2-like phenotype with the expression of CD163 and CD206. Furthermore, M1-like macrophages and DCs tend to lose the expression of CD1c in cocultures to express low levels of CD163. These results confirm our previous studies where we showed that MPM cells or pleural effusions promote the differentiation of monocytes into M2-like immunosuppressive macrophages, which block the cytotoxicity of tumor antigen specific CD8+ T cells ^{13,38}. Our results are also in line with histological or flow cytometry studies that demonstrate the presence of CD163+ CD206+ macrophages in MPM tumors ⁶⁻⁸. Thus, we used this coculture model to determine whether M2-like macrophages affect MV oncolytic activity against MPM cells and reciprocally how MV modulates macrophage and tumor cell phenotypes.

In Meso34, MV replication was not altered by the presence of macrophages. Indeed, Meso34 produces its own IFN-I and is still permissive to MV replication, but less than Meso13. Defects in IFNAR signaling transduction leading to vesicular stomatitis virus permissiveness are already described ³⁹. However, we showed that exposure to MV induces ISG expression in Meso34 suggesting that IFNAR signaling is at least partly functional, but that only a set of the ISGs necessary to fully block MV replication are expressed. After ruxolitinib treatment, the expression of these ISGs is blocked in Meso34 and we observed an increased MV replication.

We also showed that macrophages, through their IFN-I production, are able to reduce MV replication in Meso13 MPM cell line, which is unable to produce IFN-I due to the loss of both copies of the genes encoding for IFN- β , IFN- ϵ , IFN- ω and for the 13 IFN- α ^{26,40}. Meso13 alone in response to MV fails to express several ISGs that are dependent on IFN-I such as *STAT1*, *MX1* and *TLR3* ²⁶. Here we show that, in presence of myeloid cells, Meso13 is able to express these genes, thus reducing MV replication. We previously estimated that, like Meso13, around 20% of patients with

MPM have tumor cells presenting homologous deletion of the IFN-I locus ^{26,40}. MV replication in these patients may be impaired, but the induction of an antiviral proinflammatory microenvironment by MV may still have favorable effects. Indeed, it was recently shown in a murine model that similar homologous deletion of *CDKN2A/IFN-I* genes in pancreatic tumors were more infiltrated by macrophages and less by activated CD8+ T cells compared to *CDKN2A* HD tumors ⁴¹. In human, deletions of *CDKN2A/B* and *IFN-I* genes were recently associated with poor prognosis as it suppresses the immune response in lung adenocarcinoma compared to *CDKN2A* deletions alone ⁴². Thus, the TME of MPM tumor with IFN-I HD is thought to be particularly cold and oncolytic immunotherapy appears as a good candidate to make it more favorable to the antitumor immune response by inducing an antiviral proinflammatory microenvironment. It may be tempting to use inhibitors of the IFN-I response such as ruxolitinib to increase viral replication, but they may also disrupt positive effects of IFN-I on the TME.

In our study, we show that MV induces an antiviral pro-inflammatory response in myeloid cells as well as in tumor cells. MV decreases the expression of the M2 specific marker CD163 on cocultured monocytes and M2 macrophages, thus suggesting a conversion toward the M1 phenotype. Our results confirm a similar study using a human breast cancer line, where Tan *et al.* showed that MV induces the modulation of monocyte-derived myeloid cells towards an anti-tumor phenotype ⁴³. It also increases the expression of both co-stimulatory molecules and HLA-DR on all types of co-cultured myeloid cells. Furthermore, the production of cytokines and chemokines is more diversified and massive when myeloid cells are present. Some of the chemokines such as CXCL10 and CXCL11 are known to attract effector T cells ⁴⁴. This chemoattracting effect of MV on T cells and NK was also observed in colorectal and pancreatic cancer mouse model ⁴⁵⁻⁴⁷. In these studies, the authors also showed a synergy of MV virotherapy with anti-PD1 treatment. In human, the only FDA and EMA approved OV, the T-vec (Imlygic[®], Amgen), has been shown to attract immune cells in melanoma tumors notably T cells ⁴⁸. Our study suggests that MV should be of particular interest to induce T cell infiltration in MPM tumors. Furthermore, in these animals and human studies, the OVs have been shown to induce PD-L1 expression in tumors and increase anti-PD1 efficacy ⁴⁵⁻⁴⁸. This increase in PD-L1 expression on tumor and myeloid cells was also identified in our study during MV infection suggesting that a combination of MV with checkpoint inhibitor immunotherapy may be envisaged to treat mesothelioma with a likely better efficacy than MV alone.

In conclusion, our study characterizes the interplay of MV with human MPM cells and M2-like macrophages. These myeloid cells can have negative effects like decreasing viral replication, but also positive effects by developing an antiviral proinflammatory response that may reshape the TME and favor the antitumor immune response. Thus, oncolytic MV can be an interesting candidate for MPM treatment, especially in the context of immunotherapy.

APPENDIX

Acknowledgements

The authors acknowledge the Cytocell - Flow Cytometry and FACS core facility (SFR Bonamy, BioCore, Inserm UMS 016, CNRS UAR 3556, Nantes, France) for its technical expertise and help, member of the Scientific Interest Group (GIS) Biogenouest and the Labex IGO program supported by the French National Research Agency (n°ANR-11-LABX-0016-01). We thank IBISA MicroPICell facility (Biogenouest), member of the national infrastructure France-Bioimaging supported by the French national research agency (ANR-10-INBS-04) and the Genomics Core Facility GenoA, member of the Biogenouest and Institut Français de Bioinformatique (IFB)(ANR-11-INBS-0013). We thank Sophie Deshayes for the establishment of the malignant pleural mesothelioma cell lines and Maureen Labbé for her help with bioinformatics analysis. Schematics were created with Biorender.com.

Author contributions

Conceptualization: CCh, MG, JFF; Performed experiments: CCh, LB, MG, JF, JN; Data analysis: CCh, LB, JF, NJ; Writing-original draft: CCh, JFF; Writing-review&editing: CCh, JFF, LT, DF, CB, NB, NJ, UH, TP; Funding acquisition: EPT, LT, DF, CB, NB, JFF, FT.

Data availability statement

The transcriptomic data that support the findings of this study are available online on the GEO Omnibus site (GSE247526). Other raw data and materials can be made available upon reasonable request to the corresponding author.

REFERENCES

1. 1.Yap TA, Aerts JG, Popat S, Fennell DA. Novel insights into mesothelioma biology and implications for therapy. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(8):475-488. doi:10.1038/nrc.2017.42
2. Popat S, Baas P, Faivre-Finn C, et al. Malignant pleural mesothelioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up☆. *Annals of Oncology*. 2022;33(2):129-142. doi:10.1016/j.annonc.2021.11.005
3. Govindan R, Aggarwal C, Antonia SJ, et al. Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) clinical practice guideline on immunotherapy for the treatment of lung cancer and mesothelioma. *J Immunother Cancer*. 2022;10(5):e003956. doi:10.1136/jitc-2021-003956
4. Baas P, Scherpereel A, Nowak AK, et al. First-line nivolumab plus ipilimumab in unresectable malignant pleural mesothelioma (CheckMate 743): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*. 2021;397(10272):375-386. doi:10.1016/S0140-6736(20)32714-8
5. Cristescu R, Mogg R, Ayers M, et al. Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade-based immunotherapy. *Science*. 2018;362(6411):eaar3593. doi:10.1126/science.aar3593
6. Minnema-Luiting J, Vroman H, Aerts J, Cornelissen R. Heterogeneity in Immune Cell Content in Malignant Pleural Mesothelioma. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(4):1041. doi:10.3390/ijms19041041
7. Marcq E, Siozopoulou V, De Waele J, et al. Prognostic and predictive aspects of the tumor immune microenvironment and immune checkpoints in malignant pleural mesothelioma. *OncImmunology*. 2017;6(1):e1261241. doi:10.1080/2162402X.2016.1261241
8. Klampatsa A, O'Brien SM, Thompson JC, et al. Phenotypic and functional analysis of malignant mesothelioma tumor-infiltrating lymphocytes. *OncImmunology*. 2019;8(9):e1638211. doi:10.1080/2162402X.2019.1638211
9. Circulating and tumor-infiltrating myeloid cells predict survival in human pleural mesothelioma - Burt - 2011 - Cancer - Wiley Online Library. Accessed October 11, 2023. <https://acsjournals-onlinelibrary-wiley-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/10.1002/cncr.26143>
10. Schinwald A, Donaldson K. Use of back-scatter electron signals to visualise cell/nanowires interactions in vitro and in vivo; frustrated phagocytosis of long fibres in macrophages and compartmentalisation in mesothelial cells in vivo. *Part Fibre Toxicol*. 2012;9(1):1-14. doi:10.1186/1743-8977-9-34
11. Dostert C, Pétrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate Immune Activation Through Nalp3 Inflammasome Sensing of Asbestos and Silica. *Science*. 2008;320(5876):674-677. doi:10.1126/science.1156995
12. Chéné AL, d'Almeida S, Blondy T, et al. Pleural Effusions from Patients with Mesothelioma Induce Recruitment of Monocytes and Their Differentiation into M2 Macrophages. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2016;11(10):1765—1773. doi:10.1016/j.jtho.2016.06.022

13. Blondy T, d'Almeida SM, Briolay T, et al. Involvement of the M-CSF/IL-34/CSF-1R pathway in malignant pleural mesothelioma. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2020;8(1). doi:10.1136/jitc-2019-000182
14. Shek D, Gloss B, Lai J, et al. Identification and Characterisation of Infiltrating Immune Cells in Malignant Pleural Mesothelioma Using Spatial Transcriptomics. *Methods and Protocols*. 2023;6(2):35. doi:10.3390/mps6020035
15. Bejarano L, Jordão MJC, Joyce JA. Therapeutic Targeting of the Tumor Microenvironment. *Cancer Discov*. 2021;11(4):933-959. doi:10.1158/2159-8290.CD-20-1808
16. Wang N, Liang H, Zen K. Molecular Mechanisms That Influence the Macrophage M1–M2 Polarization Balance. *Frontiers in Immunology*. 2014;5. Accessed October 23, 2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2014.00614>
17. Wu L, Kohno M, Murakami J, et al. Defining and targeting tumor-associated macrophages in malignant mesothelioma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2023;120(9):e2210836120. doi:10.1073/pnas.2210836120
18. Shalhout SZ, Miller DM, Emerick KS, Kaufman HL. Therapy with oncolytic viruses: progress and challenges. *Nat Rev Clin Oncol*. 2023;20(3):160-177. doi:10.1038/s41571-022-00719-w
19. Achard C, Surendran A, Wedge ME, Ungerechts G, Bell J, Ilkow CS. Lighting a Fire in the Tumor Microenvironment Using Oncolytic Immunotherapy. *EBioMedicine*. 2018;31:17-24. doi:10.1016/j.ebiom.2018.04.020
20. Msaouel P, Opyrchal M, Dispenzieri A, et al. Clinical Trials with Oncolytic Measles Virus: Current Status and Future Prospects. *Curr Cancer Drug Targets*. 2018;18(2):177-187. doi:10.2174/1568009617666170222125035
21. Gauthier A, Brandler S, Sapède-Pérez C, Boisgerault N, Tangy F, Grégoire M. Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response. *Cancer Res*. 2008;68(12):4882-4892.
22. Donnelly OG, Errington-Mais F, Steele L, et al. Measles virus causes immunogenic cell death in human melanoma. *Gene Ther*. Published online 2011. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22170342
23. Guillerme JB, Boisgerault N, Roulois D, et al. Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Clin Cancer Res*. 2013;19(5):1147-1158. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2733
24. Achard C, Guillerme JB, Bruni D, et al. Oncolytic measles virus induces tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated cytotoxicity by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Oncoimmunology*. 2017;6(1):e1261240. doi:10.1080/2162402x.2016.1261240
25. Achard C, Boisgerault N, Delaunay T, et al. Sensitivity of human pleural mesothelioma to oncolytic measles virus depends on defects of the type I interferon response. *Oncotarget*. 2015;6(42):44892–44904. doi:10.18632/oncotarget.6285
26. Delaunay T, Achard C, Boisgerault N, et al. Frequent Homozygous Deletions of Type I Interferon Genes in Pleural Mesothelioma Confer Sensitivity to Oncolytic Measles Virus.

- Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2020;15(5):827—842. doi:10.1016/j.jtho.2019.12.128
27. Gueugnon F, Leclercq S, Blanquart C, et al. Identification of Novel Markers for the Diagnosis of Malignant Pleural Mesothelioma. *The American Journal of Pathology*. 2011;178(3):1033-1042. doi:10.1016/j.ajpath.2010.12.014
 28. Combredet C, Labrousse V, Mollet L, et al. A molecularly cloned Schwarz strain of measles virus vaccine induces strong immune responses in macaques and transgenic mice. *J Virol*. 2003;77(21):11546-11554. doi:10.1128/jvi.77.21.11546-11554.2003
 29. Monaco G, Chen H, Poidinger M, Chen J, de Magalhães JP, Larbi A. flowAI: automatic and interactive anomaly discerning tools for flow cytometry data. *Bioinformatics*. 2016;32(16):2473-2480. doi:10.1093/bioinformatics/btw191
 30. Van Gassen S, Callebaut B, Van Helden MJ, et al. FlowSOM: Using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry data. *Cytometry A*. 2015;87(7):636-645. doi:10.1002/cyto.a.22625
 31. McInnes L, Healy J, Saul N, Gro  berger L. UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection. *Journal of Open Source Software*. 2018;3(29):861. doi:10.21105/joss.00861
 32. Belkina AC, Ciccolella CO, Anno R, Halpert R, Spidlen J, Snyder-Cappione JE. Automated optimized parameters for T-distributed stochastic neighbor embedding improve visualization and analysis of large datasets. *Nat Commun*. 2019;10(1):5415. doi:10.1038/s41467-019-13055-y
 33. Pearson K. LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*. 1901;2(11):559-572. doi:10.1080/14786440109462720
 34. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676-682. doi:10.1038/nmeth.2019
 35. Charpentier E, Cornec M, Dumont S, et al. 3' RNA sequencing for robust and low-cost gene expression profiling. Published online January 28, 2021. doi:10.21203/rs.3.pex-1336/v1
 36. Taverna F, Goveia J, Karakach TK, et al. BIOMEX: an interactive workflow for (single cell) omics data interpretation and visualization. *Nucleic Acids Research*. 2020;48(W1):W385-W394. doi:10.1093/nar/gkaa332
 37. Ulgen E, Ozisik O, Sezerman OU. pathfindR: An R Package for Comprehensive Identification of Enriched Pathways in Omics Data Through Active Subnetworks. *Frontiers in Genetics*. 2019;10. Accessed October 11, 2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2019.00858>
 38. Lievense LA, Cornelissen R, Bezemer K, Kaijen-Lambers MEH, Hegmans JPJJ, Aerts JGJV. Pleural Effusion of Patients with Malignant Mesothelioma Induces Macrophage-Mediated T Cell Suppression. *J Thorac Oncol*. 2016;11(10):1755-1764. doi:10.1016/j.jtho.2016.06.021
 39. Stojdl DF, Lichty B, Knowles S, et al. Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat Med*. 2000;6(7):821-825. doi:10.1038/77558

40. Grard M, Chatelain C, Delaunay T, Pons-Tostivint E, Bennouna J, Fonteneau JF. Homozygous Co-Deletion of Type I Interferons and CDKN2A Genes in Thoracic Cancers: Potential Consequences for Therapy. *Front Oncol.* 2021;11:695770. doi:10.3389/fonc.2021.695770
41. Barriga FM, Tsanov KM, Ho YJ, et al. MACHETE identifies interferon-encompassing chromosome 9p21.3 deletions as mediators of immune evasion and metastasis. *Nat Cancer.* 2022;3(11):1367-1385. doi:10.1038/s43018-022-00443-5
42. Peng Y, Chen Y, Song M, et al. Co-occurrence of CDKN2A/B and IFN-I homozygous deletions correlates with an immunosuppressive phenotype and poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Molecular Oncology.* 2022;16(8):1746-1760. doi:10.1002/1878-0261.13206
43. Tan DQ, Zhang L, Ohba K, Ye M, Ichiyama K, Yamamoto N. Macrophage response to oncolytic paramyxoviruses potentiates virus-mediated tumor cell killing. *Eur J Immunol.* 2016;46(4):919-928. doi:10.1002/eji.201545915
44. Karin N. CXCR3 Ligands in Cancer and Autoimmunity, Chemoattraction of Effector T Cells, and Beyond. *Frontiers in Immunology.* 2020;11. Accessed October 11, 2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00976>
45. Veinalde R, Pidelaserra-Martí G, Moulin C, et al. Virotherapy combined with anti-PD-1 transiently reshapes the tumor immune environment and induces anti-tumor immunity in a preclinical PDAC model. *Frontiers in Immunology.* 2023;13. Accessed October 19, 2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.1096162>
46. Backhaus PS, Veinalde R, Hartmann L, et al. Immunological Effects and Viral Gene Expression Determine the Efficacy of Oncolytic Measles Vaccines Encoding IL-12 or IL-15 Agonists. *Viruses.* 2019;11(10). doi:10.3390/v11100914
47. Busch E, Kubon KD, Mayer JKM, et al. Measles Vaccines Designed for Enhanced CD8+ T Cell Activation. *Viruses.* 2020;12(2):242. doi:10.3390/v12020242
48. Ribas A, Dummer R, Puzanov I, et al. Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy. *Cell.* 2018;174(4):1031-1032. doi:10.1016/j.cell.2018.07.035

SUPPLEMENTAL FIGURES

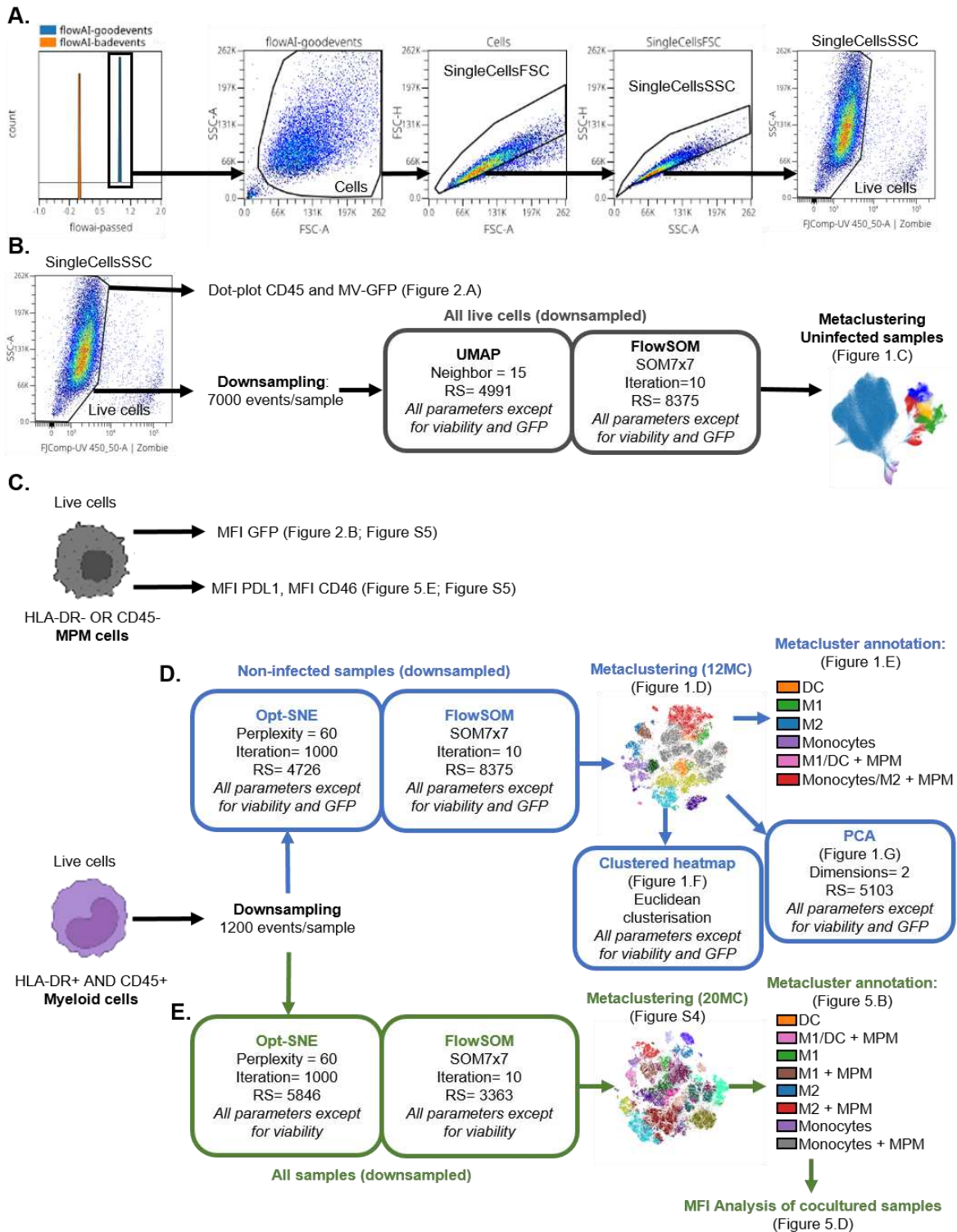


Figure S1 | Gating strategy for cytometry. Myeloid cells were cultured alone or with MPM cells for 96h. After 24h, some of the cocultures were infected with MV-GFP. They were then analyzed by flow cytometry for the expression of 13 markers. (A) Datas were cleaned using the FlowAI algorithm with default settings. Cells were manually gated to remove aggregates, debris and doublets. Compensations and axis scaling were performed. Then, live cells were

← manually gated. (B) Further analysis were conducted on all live cells to distinguish myeloid cells from MPM cells (C) MPM cells were gated and the MFI of GFP, PDL1 and CD46 were analyzed. (D-E) Myeloid cells were gated. (D) Further analysis were conducted on uninfected samples to study the differentiation of myeloid cells in cocultures compared to control cells. (E) Further analyses were performed on all samples to study the effect of MV in coculture on myeloid cell phenotype. DC, dendritic cell; M1, M1-like macrophage; M2-like macrophage; MC, metacluster; MFI, median fluorescence intensity; MPM, malignant pleural mesothelioma; MV, Infected with MV; NI, Uninfected; Opt-SNE, optimized parameters for T-distributed stochastic neighbor embedding ; PCA, principal component analysis; RS, random seed; SOM, self-organizing map; UMAP, Uniform Manifold Approximation and Projection.

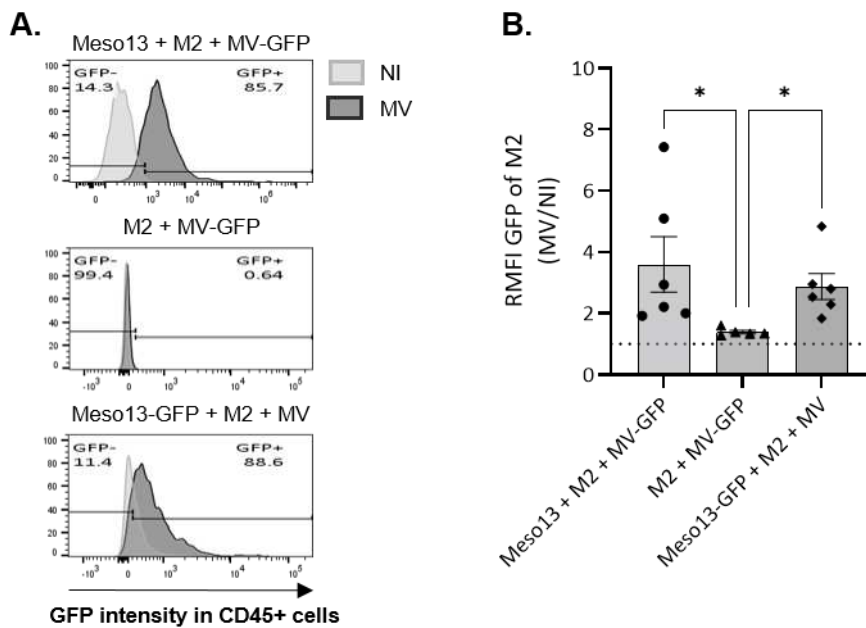


Figure S2 | MV infection in tumor cells increases GFP uptake by macrophages. M2 were cultured either alone or with Meso13 and were infected with MV-GFP. They were also cultured with Meso13 expressing GFP (Meso13-GFP) and infected with a non-fluorescent MV. Cocultures were stained with a CD45-APC antibody and (A) GFP intensity was measured in CD45+ cells. (B) GFP relative MFI (RMFI) corresponds to the MFI ratio of CD45+ cells cocultured with infected cells over CD45+ cells cocultured with uninfected cells (n=5 or 6 donors, Kruskal-Wallis test). M2, M2-like macrophages; MV, Infected with MV; NI, Uninfected.

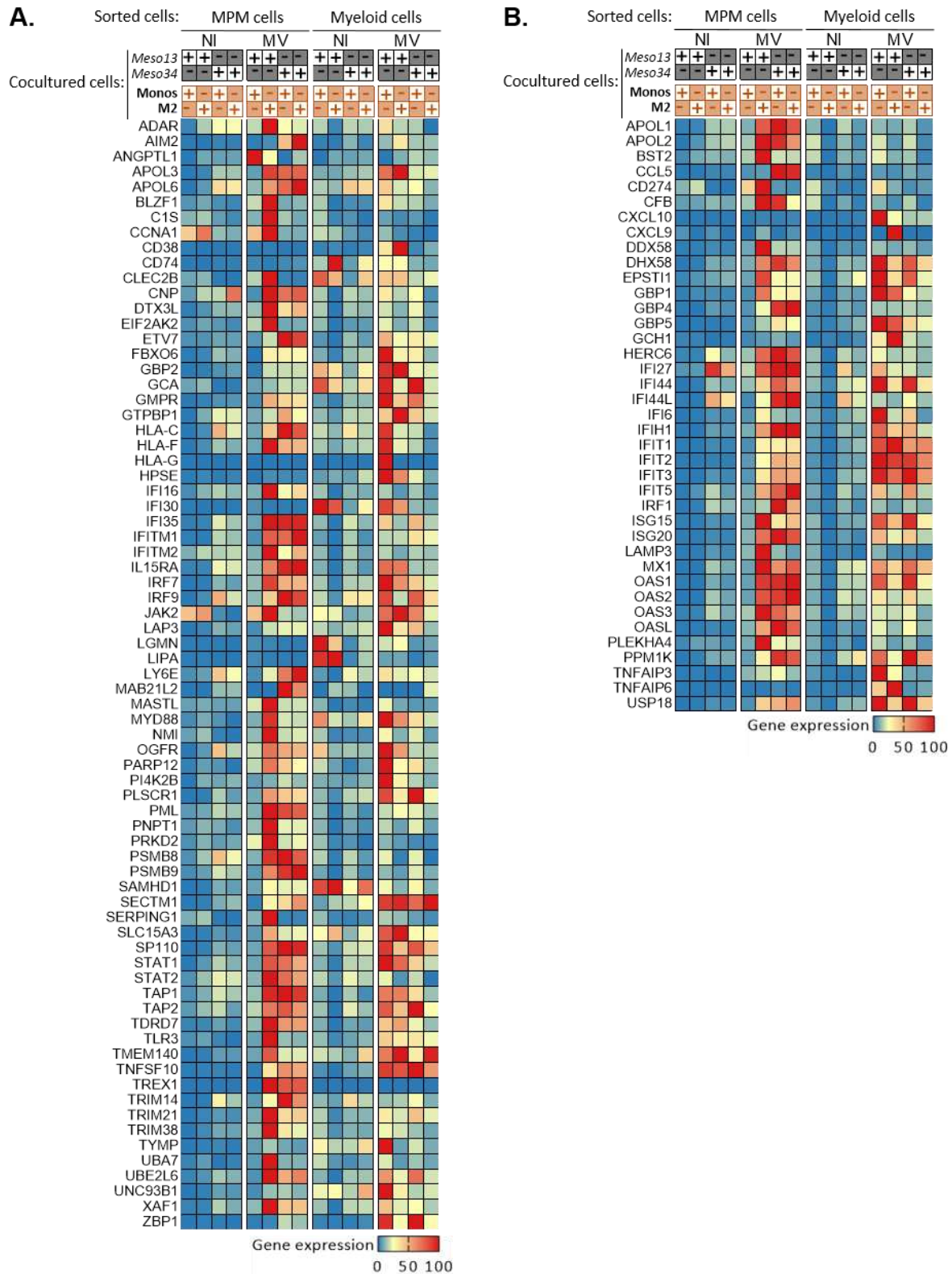


Figure S3 | ISG expression in cocultured cells. Meso13 and Meso34 were cultured with monocytes or M2. After 24h, MPM cells were infected or not with MV-GFP at MOI=1. After 72h of infection, cells in cocultures were sorted according to CD45 expression. A 3'RNA sequencing was performed on each cell type. Expression of the ISG strictly dependant of IFN-I (A) or non strictly dependant of IFN-I (B) 72h after infection is normalized by line. M2, M2-like macrophages; Monos, monocytes; MPM, malignant pleural mesothelioma; MV, Infected with MV; NI, Uninfected.

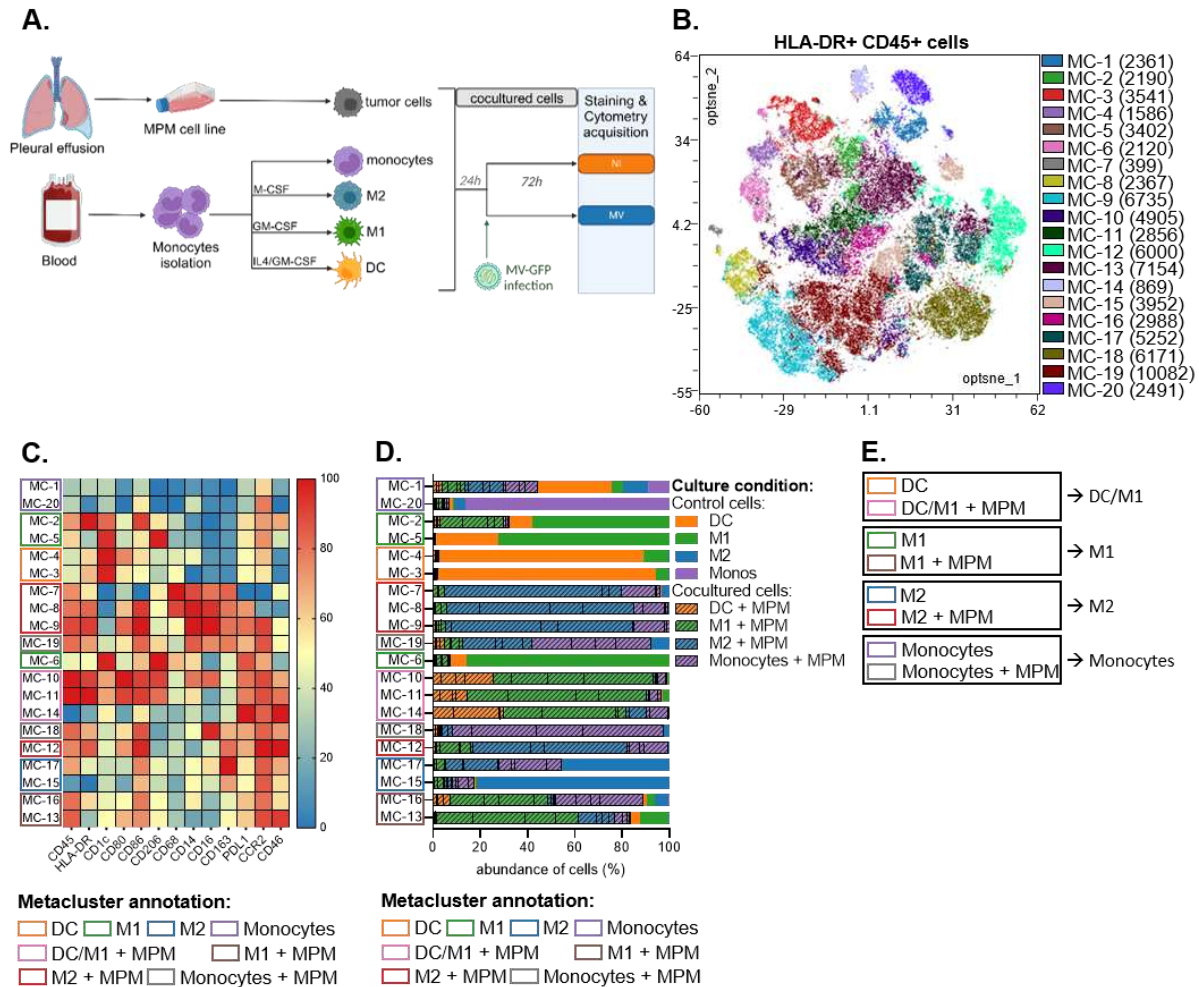


Figure S4 | Annotation strategy for MFI analysis of myeloid cells cocultured with MPM cells infected or not.

Myeloid cells were cultured alone or with MPM cells for 96h. After 24h, some of the cocultures were infected with MV-GFP. They were analyzed at 96h by flow cytometry for the expression of 13 markers. (A) Experimental design. (B) All samples were gated, clustered and metaclustered as shown in supplementary FigureS1. Metaclusters are shown on an Opt-SNE dimensional reduction. The number of cells for each metacluster is shown in brackets. (C) The median of fluorescence intensity (MFI) of each marker on the different metaclusters is normalised by column. (D) The abundance of each culture type in metaclusters was assessed. Groups of metaclusters were annotated with wide shapes. (E) Based on their annotation, metaclusters were attributed to 4 category of myeloid cells for further MFI analysis. DC, dendritic cell; M1, M1-like macrophage; M2-like macrophage; MC, metacluster; MPM, malignant pleural mesothelioma; MV, Infected with MV; NI, Uninfected.

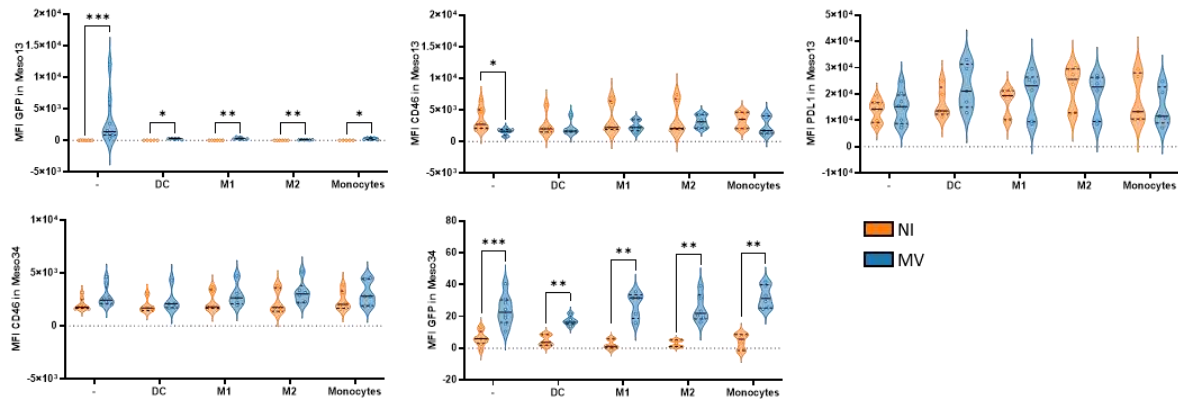


Figure S5 | Expression of GFP, CD46 and PDL1 in MPM cells upon infection. MPM cells were cultured alone or with myeloid cells for 96h. After 24h, some of the cocultures were infected with MV-GFP at MOI=1 (MOI, multiplicity of infection). They were analyzed at 96h by flow cytometry for the expression of 13 markers. The MFI of GFP, CD46 and PDL1 were assessed in the MPM cells (HLA-DR and CD45 negative population) cocultured or not with myeloid cells (n=5 donors for monocytes and DC, n=6 donors for M1 and M2, n=8 for MPM cell lines alone, Mann-Whitney test). DC, dendritic cell; M1, M1-like macrophage; M2-like macrophage; MC, metacluster; MFI, median fluorescence intensity; MPM, malignant pleural mesothelioma; MV, Infected with MV; NI, Uninfected.

DISCUSSION



REMISE EN CONTEXTE DES PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS

Notre équipe a montré que la réplication de la souche Schwarz du virus oncolytique de la rougeole dans des lignées tumorales de MPM déclenche une mort immunogène capable d'induire une réponse immunitaire adaptative dirigée contre les cellules tumorales ^{52,146,182,185}. Lors de leur thèse dans l'équipe, Carole Achard et Tiphaine Delaunay ont montré que les lignées cancéreuses de MPM sont permissives à la réplication du MV, car elles possèdent des défauts de la réponse IFN-I ^{94,142}. Ces défauts se situent avant ou après le récepteur ubiquitaire IFNAR. Au début de ce projet, nous avons émis l'hypothèse que, lors de l'infection par le MV, la production d'IFN-I des cellules non malignes du TME, en particulier des macrophages, peut compenser le défaut de production d'IFN-I par les cellules cancéreuses. Cette production inhiberait la réplication du MV dans les cellules tumorales ayant une signalisation IFNAR fonctionnelle, mais pas dans celles dont le défaut de la voie se situe après IFNAR.

Pour mimer le TME du MPM *in vitro*, j'ai réalisé des cocultures de cellules de MPM en présence de monocytes ou de cellules dérivées de monocytes (DC, macrophages M1 ou M2) issus de PBMC humains. J'ai confirmé dans un premier temps que les monocytes cultivés en présence de cellules de MPM se différencient vers un phénotype de macrophage de type M2. J'ai également montré qu'elles peuvent réorienter des cellules déjà différenciées comme des M1 et des DC vers un phénotype qui se rapproche de celui des macrophages M2. J'ai ensuite observé que la présence de ces cellules myéloïdes diminue la réplication du MV dans les cellules tumorales ayant un défaut de production des IFN-I, mais pas dans celles dont le défaut de la réponse IFN-I se situe après IFNAR. De plus, l'infection des cellules tumorales par le MV induit la transcription de nombreux gènes appartenant à l'immunité innée dans les monocytes, les macrophages de type M2 ainsi que les cellules tumorales. Cela permet la sécrétion d'IFN-I dans le surnageant des cocultures et l'induction d'un programme transcriptionnel antiviral dans les cellules tumorales incapables de produire de l'IFN-I par elles-mêmes. Ces résultats confirment ainsi notre hypothèse de départ. En outre, j'ai montré que l'infection des cellules tumorales permet la sécrétion de nombreuses autres cytokines pro-inflammatoires dans les cocultures. De plus, de nombreuses chimiokines sont exprimées par les cellules tumorales et par les cellules myéloïdes en réponse au MV. Le MV provoque aussi l'augmentation de molécules de costimulation sur les cellules myéloïdes et l'expression de PDL1 sur les cellules tumorales et myéloïdes des cocultures. Dans leur ensemble, mes résultats suggèrent que le MV redéfinit le phénotype des cellules myéloïdes du TME en induisant une réponse inflammatoire antivirale qui pourrait être capable de restaurer l'action antitumorale du système immunitaire.

LE MPM ORIENTE LE PHENOTYPE DES CELLULES DERIVEES DE MONOCYTES

Les macrophages sont le type cellulaire le plus abondant dans l'infiltrat immunitaire du MPM ^{101-103,110}. Ils tiennent un rôle prépondérant dans l'initiation et la progression du MPM par leur production de ROS en réponse à la phagocytose contrariée de fibres d'amiante et leur acquisition par la suite d'un phénotype immunosuppresseur de type M2. L'analyse de coupes histologiques de tumeurs de MPM a montré qu'ils représentent en moyenne presque 30% de l'aire tumorale ¹¹⁰. De plus, ils sont en majorité issus de monocytes circulants qui expriment CCR2 et qui sont attirés dans la tumeur par l'expression de CCL2 ^{18,19,109}. Les monocytes recrutés peuvent également se différencier en DC.

Pour mimer cette composante du TME du MPM, j'ai réalisé des cocultures de cellules tumorales avec 30% de monocytes préalablement différenciés ou non en macrophages ou en DC. Cependant, après quatre jours, les cellules dérivées de monocytes ne représentent qu'environ 10% des cocultures. Cette diminution de leur proportion *in vitro* est probablement due à la multiplication des cellules tumorales plutôt qu'au manque de signaux de survie dans les cocultures puisque, quel que soit le type cellulaire différencié à partir de monocytes cette diminution est retrouvée. Les deux lignées de MPM utilisées dans cette étude ont une croissance similaire, mais cette hypothèse pourrait être vérifiée en réalisant ces cocultures avec une lignée dont la multiplication est moins rapide.

Dans l'équipe, nous disposons d'un modèle de culture en sphéroïdes multicellulaires (MCTS) où la proportion de cellules myéloïdes semble davantage conservée ^{111,287}. Pendant sa thèse, Marion Grard a montré que la prolifération des cellules tumorales, dont Meso13 et Meso34, est diminuée en sphéroïdes ²⁸⁷ ce qui appuie l'hypothèse de la dilution des cellules myéloïdes par la prolifération des cellules cancéreuses dans le modèle de coculture. Ce mode de culture en MCTS rend mieux compte des interactions intercellulaires au sein d'une tumeur que les cocultures en deux dimensions et le MPM s'y prête particulièrement bien ^{288,289}. L'utilisation de MCTS de MPM a permis de montrer que les monocytes se différencient en macrophages de type M2 immunosuppresseurs capables d'inhiber la cytotoxicité des lymphocytes T ¹¹¹. Cependant, l'utilisation de MCTS pour l'étude de la virothérapie est difficile, car ce modèle se prête mal à la réplication virale et à la dissociation de cellules fragilisées par le virus, limitant ainsi les études par cytométrie en flux ou le tri cellulaire. J'ai donc choisi de travailler avec un modèle de coculture en deux dimensions avec des cellules tumorales et des monocytes différenciés ou non.

Une fois recrutés au site tumoral, les monocytes peuvent se différencier en DC ou en macrophages ^{14,16}. J'ai donc différencié des monocytes en DC en utilisant du GM-CSF et de l'IL-4 ⁵³.

Les macrophages, quant à eux, suivent un continuum phénotypique *in vivo* et possèdent des fonctions très diversifiées. Les macrophages associés aux tumeurs sont connus pour être à la fois responsables de l'inflammation, comme dans le MPM avec la phagocytose contrariée de fibres d'amiante, mais aussi pour avoir un rôle immunosuppresseur et résolutif qui soutient la croissance tumorale. Pour mimer cette hétérogénéité fonctionnelle, j'ai utilisé du GM-CSF, une cytokine produite en grande quantité dans un contexte inflammatoire et immuno-activateur ²⁹⁰ pour différencier des monocytes en macrophages aux fonctions pro-inflammatoires que j'ai qualifié de M1. En parallèle, j'ai différencié des monocytes avec du M-CSF, une cytokine sécrétée par les cellules tumorales et retrouvée dans de nombreuses tumeurs ^{111,291}, pour obtenir des macrophages au phénotype plus immunosuppresseur que j'ai qualifié de M2. Le M-CSF est présent dans tous les liquides pleuraux associés au MPM et la présence de son transcrit dans les biopsies de la collection du TCGA corrèle avec des marqueurs de macrophages de type M2 comme CD14, CD163 ou l'IL10 ¹¹¹. Pour discriminer les différents types cellulaires dans cette étude, nous avons, entre autres, choisi les marqueurs CD1c, CD206 et CD163 comme marqueurs spécifiques des DC, M1 et M2 respectivement. L'expression de ces marqueurs sur les populations contrôle met en avant le continuum phénotypique de ces cellules et montre par exemple une co-expression de CD1c avec CD206 sur les M1, et une expression modérée de CD206 avec CD163 sur les M2.

Les monocytes, les macrophages de type M1 ou M2 ainsi que les DC adoptent de nouveaux phénotypes au contact des cellules cancéreuses de MPM. Cela souligne l'intégration de ces types cellulaires dans le TME et l'importance de les étudier dans un contexte tumoral. Les monocytes et les macrophages de type M2 déjà différenciés développent des phénotypes très proches dont les marqueurs sont retrouvés sur les macrophages protumoraux « contrôles » de type M2. Ils expriment notamment CD163 qui est un des marqueurs les plus spécifiques des macrophages M2 retrouvés dans le MPM ²⁹². En outre, la co-culture avec le MPM exacerbe l'expression d'autres marqueurs comme le récepteur d'endocytose CD206. Une expression élevée de CD206 est d'ailleurs retrouvée sur les macrophages de type M2 de biopsies de MPM ^{102,110,292}. La culture avec des cellules cancéreuses de MPM influe également le devenir de M1 et de DC préalablement différenciés. Ils perdent notamment l'expression de CD1c, impliqué dans la présentation d'antigène et acquièrent une expression modérée de CD163 ce qui suggère que les cellules tumorales réorientent les macrophages pro-inflammatoires et les DC vers un phénotype intermédiaire entre M1, DC et M2 qui pourraient avoir un rôle immunosuppresseur. Ainsi, l'utilisation de ces quatre types de cellulaires semble mimer différents stades de différenciation des monocytes et des cellules myéloïdes recrutés dans le TME du MPM. Ces observations ont été réalisées au terme de quatre jours de coculture, mais il serait intéressant de regarder si une coculture plus longue aboutit à un stade de différenciation similaire pour toutes les cellules dérivées de monocytes, quel que soit leur état de différenciation initial.

Globalement, l'orientation du phénotype de cellules dérivées de monocytes vers un phénotype de macrophage M2 au contact des cellules du MPM est cohérente avec la littérature. Au sein de l'équipe, Thibaut Blondy a montré que 90% des monocytes dans des MCTS de MPM adoptent un phénotype de macrophages M2 ¹¹¹. Le contenu des épanchements pleuraux de MPM est également capable d'induire cette différenciation en macrophages de type M2 ^{19,112} qui sont capables d'induire une immunosuppression des lymphocytes T ¹¹². Dans le MPM, une concentration élevée de monocytes circulants ¹¹⁰ ou un infiltrat tumoral riche en macrophages de type M2 ^{64,293} sont de mauvais pronostic pour le patient. Dans un modèle murin de MPM, la déplétion des macrophages de type M2 promeut le rejet de la tumeur ¹¹⁴. Cet article montre que les macrophages dérivés de monocytes ont un rôle clé dans la progression tumorale tandis que les macrophages résidents contribuent au contraire à la réponse immunitaire antitumorale. Une approche visant à dépléter la totalité des macrophages tumoraux ne permettrait pas de profiter de leur rôle immunitaire. L'utilisation d'OV dans le MPM vise à modifier le phénotype acquis par les macrophages afin d'induire un environnement moins immunosuppresseur. Les résultats que j'ai acquis sur la différenciation des monocytes, des macrophages de type M1 et M2 ainsi que des DC justifient l'utilisation de ces cocultures pour étudier l'interaction des OV avec les cellules myéloïdes et les cellules tumorales.

LE TME INTERFERE AVEC L'EXPRESSION DU TRANSGENE VIRAL

J'ai utilisé la souche vaccinale Schwarz du MV, modifiée par l'équipe de Frédéric Tangy pour exprimer la *green fluorescent protein* (GFP). Ce virus est probablement plus immunogène qu'un virus non modifié, car l'insertion d'un gène supplémentaire dans le génome du MV augmente la probabilité d'un arrêt précoce de la polymérase et ainsi le nombre de copies d'ARN génomiques défectives produites (DI-RNA, 5'copy-back defective interfering genomes) ¹⁴⁸. Ces DI-RNA se présentent sous une forme d'ARN double brin et, avec les extrémités 5'-triphosphate du génome viral ²⁹⁴, sont reconnues par les RLR, ce qui active la réponse IFN-I. L'intensité de fluorescence de la GFP dans les cellules permet d'estimer la réplication virale, mais ne permet pas de déterminer le nombre de copies de génomes ou de particules infectieuses produites, pour lesquelles il faudrait respectivement réaliser une PCR quantitative ou une titration par *median tissue culture infectious dose* (TCID₅₀). L'expression de la GFP dépend de la machinerie cellulaire et permet de mesurer la production de protéines codées par le génome viral, dont celles nécessaires à la réplication du virus. Elle reste donc un bon moyen d'évaluer la réplication du MV, mais aussi d'estimer la production d'une protéine thérapeutique dont on voudrait insérer le gène dans le MV.

J'ai montré que la présence de monocytes ou de macrophages diminue la production de GFP dans la lignée Meso13, ce qui suggère une inhibition de la réplication virale. Cette lignée a une délétion homozygote des gènes codant les IFN-I et, par conséquent, est incapable d'en produire. Cependant, lors de l'infection par le MV-GFP, de l'IFN- α 2 et - β sont retrouvés dans le surnageant des cocultures avec des monocytes ou des macrophages de type M2. De plus, la coculture de la lignée Meso13 avec des cellules myéloïdes permet l'induction d'ISG dont l'expression dans les cellules de MPM est strictement dépendante de la signalisation par le récepteur IFNAR, comme *STAT1*, *TLR3* et *MX1*. Ces ISG et d'autres dépendants de la signalisation par IFNAR ne sont pas exprimés dans la lignée Meso13 cultivée seule ⁹⁴. Enfin, l'inhibition de la signalisation IFNAR au niveau de la Janus kinase permet de restaurer la production de GFP dans les cocultures. Les protéines Jak1/2 appartenant à d'autres voies de signalisation, l'utilisation d'un anticorps inhibiteur dirigé contre IFNAR aurait été plus avisée pour valider ce dernier point. Toutefois, ces résultats confirment que la production d'IFN-I par les cellules myéloïdes est capable de limiter la réplication virale dans les lignées tumorales ayant une délétion des gènes IFN-I. Les travaux de l'équipe permettent d'estimer que ces délétions sont trouvées chez environ un patient atteint de MPM sur cinq ⁹⁴. Cette inhibition pourrait notamment limiter la production d'un transgène thérapeutique dans ces lignées. Il serait intéressant d'étendre ces résultats pour les sept autres lignées de la biocollection de l'équipe possédant aussi la délétion homozygote des gènes IFN-I.

Étonnamment, la réplication virale dans les Meso13 semble plus fortement inhibée par la présence de M1 que de DC. Pourtant, après 96h de culture avec des cellules de MPM ces deux types cellulaires semblent exprimer les mêmes marqueurs. Il est possible que lors de l'infection avec le MV-GFP, qui s'effectue 24h après le début de la coculture, les DC et les M1 n'aient pas encore convergé vers le même phénotype et que la présence de virus permette de les orienter vers différents phénotypes. Cette supposition est appuyée par l'apparition, lors de l'infection par le MV-GFP, de clusters dans les cocultures avec des DC qui sont distincts de ceux retrouvés dans les cocultures avec les M1. Cette différence d'orientation peut s'expliquer par la permissivité des DC à la réplication virale qui n'a pas lieu dans les macrophages différenciés avec du GM-CSF^{182,196,295}. Cette réplication est capable d'induire l'apoptose des DC, ce qui limiterait ainsi la production et la disponibilité d'IFN-I pour inhiber la réplication dans les cellules tumorales. De plus, il n'est pas exclu que les DC puissent servir de réservoir de MV dans les cocultures et favoriser la réplication virale dans les cellules tumorales²⁹⁶.

Le deuxième modèle de lignée permissive étudié, représenté par Meso34, est capable de produire des IFN-I. En réponse au virus la cellule exprime des ISG strictement dépendants de la réponse IFN-I ce qui montre que la signalisation IFNAR est fonctionnelle. Ces ISG sont capables de limiter en partie la réplication virale. D'autres ISG nécessaires à l'inhibition totale de la réplication du MV sont probablement absents de cette lignée. En effet, une étude de 2014 montre que contrairement à d'autres virus, aucun des 350 ISG étudiés n'est capable d'inhiber à lui seul plus de 50% de la réplication du MV²⁵⁵. Cela suggère que pour une inhibition totale de la réplication, il faut l'expression d'un ensemble d'ISG, dont une partie seulement est exprimée par Meso34. De manière cohérente, la production d'IFN-I par les cellules myéloïdes n'a pas d'effet sur la réplication virale dans la lignée Meso34. Toutefois, l'inhibition de la signalisation après IFNAR avec du ruxolitinib permet la production de davantage de GFP, probablement parce que certains ISG qui freinent la réplication du MV comme IFITM1 et BST2 sont inhibés dans cette condition.

Un autre type de défaut de la réponse IFN-I situé dans la cascade de signalisation après IFNAR est décrit¹⁷⁵. Dans les lignées présentant ce type de défaut, la production d'IFN-I par les cellules tumorales n'inhibe pas la réplication du MV, car la signalisation défaillante d'IFNAR ne permet pas l'expression d'ISG contrairement au cas de Meso34. Il est donc probable qu'avec ce type de défaut dans les cellules tumorales, la réplication virale ne soit pas inhibée par la production d'IFN-I des cellules myéloïdes.

Mes résultats indiquent que la présence de macrophages dans le TME pourrait diminuer l'expression de transgènes thérapeutiques visant à améliorer l'activité oncolytique du MV. Plusieurs études chez la souris montrent en effet une augmentation de l'efficacité du MV lorsqu'il est modifié pour exprimer de l'IL-12, de l'IL-15 ou un anti-PD1^{264,266,297}. Pour améliorer la

réplication du MV dans les cellules cancéreuses, mais aussi l'expression de protéines thérapeutiques il serait donc intéressant d'inhiber la voie de signalisation IFNAR uniquement dans les cellules tumorales. En collaboration avec Gilles Uzé de l'IRMB de Montpellier, les travaux de Thomas Ogor, qui a réalisé sa thèse dans l'équipe et qui sont toujours en cours visent justement à cibler uniquement le récepteur IFNAR des cellules cancéreuses pour améliorer la réplication des OV dans ces dernières ²⁹⁸. Cette stratégie consiste à coupler un *nanobody* qui inhibe IFNAR avec une très faible affinité, à un *nanobody* qui reconnaît un marqueur tumoral. Lorsque le second *nanobody* est accroché à la cellule tumorale, le premier *nanobody* gagne assez en avidité pour inhiber IFNAR. Outre l'amélioration de la réplication virale exclusivement dans les cellules tumorales, une telle stratégie permettrait de maintenir l'effet positif des IFN-I sur la stimulation d'une réponse immunitaire antitumorale que j'ai pu observer pendant ma thèse et qui fait l'objet de la suite de cette discussion.

L'INFECTION PAR LE MV INDUIT UNE REPONSE PRO-INFLAMMATOIRE DANS LE TME

Plusieurs études chez la souris montrent que la réponse antitumorale induite par les OV ne corrélient pas nécessairement avec le niveau de réplication virale dans les cellules tumorales^{194,299-303}. L'effet des OV semble davantage conditionné par la manière dont ils activent la réponse immunitaire innée puis adaptative^{122,304}. Ainsi, chez la souris, l'inactivation de voies de signalisation et d'activation de la réponse immunitaire innée, en particulier les voies des TLR ou de l'IL-1 β , conduit à un effet oncolytique atténué du VSV³⁰⁵, tandis que la lyse de cellules de l'immunité innée limite l'activité oncolytique d'un MV modifié¹⁹³. Ces résultats suggèrent un rôle important de la réponse IFN-I dans l'efficacité des OV, puisque les voies de TLR aboutissent à cette réponse. Il est d'ailleurs montré que les IFN-I sont indispensables à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative médiée par les lymphocytes T^{306,307}.

Mes résultats dans un modèle de coculture de cellules humaines montrent que la réplication du MV permet l'établissement d'une réponse antivirale et pro-inflammatoire par les cellules myéloïdes, comme le montre l'expression de nombreux ISG ainsi que des chimiokines et des cytokines de l'inflammation. De plus, la présence de MV modifie l'expression des récepteurs de surface des cellules myéloïdes en favorisant l'expression de molécules de costimulation et en diminuant l'expression du récepteur CD163 sur les M2, suggérant que le MV redirige les différentes cellules myéloïdes vers un phénotype moins immunosuppresseur, davantage capable de soutenir une réponse antitumorale. Des expériences supplémentaires d'inhibition de la réponse IFN-I par des anticorps inhibiteurs d'IFNAR seraient toutefois nécessaires pour confirmer l'implication de cette cytokine dans les changements phénotypiques des cellules en cocultures.

Cette transition phénotypique est également observée avec l'utilisation d'un adénovirus oncolytique dans le glioblastome³⁰⁸. Elle dépend de la présence simultanée de particules virales et de multiples cytokines pro-inflammatoires dans le TME, les auteurs soulignent d'ailleurs le rôle de la voie IFN-I dans cette réponse sans toutefois mesurer la production de ces cytokines. Dans cet article, la transition phénotypique s'effectue en parallèle de la phagocytose des cellules infectées. Dans notre étude, l'infection des cellules tumorales modifie le programme transcriptionnel des M2. Cette transition s'accompagne d'une diminution de l'expression de récepteurs de phagocytose comme *MRC1* et de l'augmentation de l'expression de gènes des voies d'apprêtement d'antigènes comme *TAP1* ou *TAP2* ainsi que l'augmentation d'HLA-DR sur les macrophages de type M2. Cette transition vers un phénotype plus immuno-activateur est également retrouvée dans un modèle de cancer du sein, où l'utilisation de deux paramyxovirus, dont le MV, augmente l'expression de CD80 et de plusieurs cytokines pro-inflammatoires dans les

cellules dérivées de monocytes ¹⁸⁸. Dans cet article, l'infection virale déclenche l'action cytotoxique des macrophages de manière indépendante de la réplication virale. Enfin, des essais cliniques ont débuté aux États-Unis avec le Voyager-1, un VSV qui code pour l'IFN- β , afin de profiter de l'action immunostimulatrice de cette cytokine bien qu'elle limite la réplication virale du VSV ³⁰⁹. À la lumière de la littérature, mes résultats suggèrent que l'action oncolytique du MV pourrait tout de même s'exercer dans le MPM grâce à l'induction d'une réponse antivirale et pro-inflammatoire dans le TME malgré la diminution de la réplication virale dans les cellules tumorales.

Il serait intéressant d'observer si cette levée de l'immunosuppression du TME est durable dans le temps ou si les macrophages se réorientent vers un phénotype tolérogène après le pic d'inflammation dû à l'infection. À plus courte échelle, l'infection par le MV recrute des effecteurs de l'immunité innée ¹⁸⁶ qui pourraient avoir une action antivirale et limiter la propagation du virus. Naumenko et ses collaborateurs suggèrent que l'injection d'une seconde dose de virus pourrait limiter cette action antivirale et favoriser le recrutement de lymphocytes T ¹⁹⁴. J'ai toutefois observé dans les cocultures infectées une augmentation de l'expression de PDL-1 sur les cellules myéloïdes et tumorales qui pourraient inhiber l'activité des lymphocytes T. L'utilisation d'IPCI en combinaison avec le MV permettrait de contourner cet écueil.

La phagocytose des cellules tumorales, l'augmentation de l'expression de gènes appartenant aux voies d'apprêtement antigéniques, l'expression de molécules de costimulation comme CD86 sur les cellules myéloïdes et l'augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires lors de l'infection des cocultures lève la question de la capacité des cellules myéloïdes en coculture à présenter des TAA aux lymphocytes T naïfs et à les primer. Pour explorer si les cellules myéloïdes cultivées avec des cellules tumorales infectées induisent une augmentation de la prolifération de lymphocytes T naïfs, nous avons essayé, avec Joëlle Nader qui est ingénieure dans l'équipe, de réaliser une expérience de *Mixed Lymphocyte Reaction* allogénique. Elle consiste à évaluer la prolifération de lymphocytes T naïfs d'un donneur en présence de cellules myéloïdes triées des cocultures infectées ou non par le MV. Cette expérience est encore en cours de mise au point.

En présence de MV les cultures avec des cellules myéloïdes produisent de nombreuses cytokines antivirales comme les IFN-I et III et compensent leur absence de production par les cellules tumorales Meso13. Ces cytokines avec d'autres dont la production augmente avec l'infection permettent probablement l'établissement d'un TME pro-inflammatoire favorable à la réponse antitumorale ¹²². Étonnamment dans les cocultures, la concentration de GM-CSF dans le surnageant diminue en présence de cellules myéloïdes alors que les cellules cancéreuses en sécrètent d'importantes quantités lors de l'infection par le MV. Cette cytokine est peut-être

consommée par les monocytes et macrophages de type M2 en coculture ce qui pourrait expliquer en partie leur réorientation phénotypique vers des macrophages de type M1 ²⁹⁰. En outre, la production de GM-CSF par les cellules tumorales lors d'une infection pourrait expliquer pourquoi son apport en tant que transgène thérapeutique ne semble pas être la meilleure stratégie, qui pourtant a été adoptée pour plusieurs OV de première génération¹²³ comme le Jx594 ³¹⁰ ou le T-VEC ²⁰¹. Malgré tout, cette cytokine soutient la réponse immunitaire et sa présence améliore l'activité oncolytique du MV dans un modèle murin immunocompétent ²⁶². Dans l'objectif de stimuler plus efficacement la réponse immunitaire, les OV les plus récents servent à vectoriser des interleukines dont l'administration est toxique si elle n'est pas localisée ¹²³, comme l'IL-12 ³¹¹. Ce type de vectorisation pourrait pallier l'absence de sécrétion de cette cytokine dans le TME, que je n'ai d'ailleurs pas retrouvée lors de l'infection des cocultures (données non montrées). L'équipe de Christine Engeland vectorise ainsi de l'IL-12 et de l'IL-15 dans le MV afin de moduler le TME et de permettre une meilleure réponse Th1 médiée par les lymphocytes T CD8+ et les NK contre la tumeur ^{265,266}.

Lors de l'infection, la surexpression par les cellules myéloïdes de récepteurs tels que CCR7 suggèrent que ces cellules pourraient migrer vers les ganglions lymphatiques. Cette hypothèse serait vérifiable en réalisant une expérience complémentaire de chimiotactisme à travers une membrane en utilisant un gradient de CCL19 et CCL21. De nombreux autres gènes codant des cytokines et des chimiokines sont surexprimés lors de l'infection comme CCL5, CXCL8/10/11 et la production de certaines de ces protéines comme CXCL8 ou CXCL10 a été validée dans cette étude. Leur production lors de l'infection conforte de précédentes données de l'équipe dans le MPM ⁹⁴ et est cohérente avec ce qui est décrit dans la littérature lors de l'infection par le MV dans le glioblastome et le carcinome hépatocellulaire ^{248,261}. La présence de ces cytokines et chimiokines suggère que l'infection avec le MV permettrait de recruter des cellules immunitaires, dont des lymphocytes T au site tumoral. Dans la littérature, l'augmentation de l'infiltrat immunitaire suite à l'utilisation d'OV est souvent retrouvée dans les modèles animaux ^{194,266,272,299,300}. Chez l'homme, l'injection intratumorale de l'HSV G47Δ dans le glioblastome montre une augmentation de l'infiltrat immunitaire, en particulier de lymphocytes T CD4 et T CD8 après traitement ¹⁹⁸. Dans le mélanome métastatique, l'utilisation du T-VEC en combinaison avec un anti-PD1 permet l'infiltration de lymphocytes T sensibles à l'inhibition de l'axe PD1/PDL1 dans la tumeur ¹⁸⁹.

PERSPECTIVES

Deux IPCI, le nivolumab et l'ipilimumab sont, depuis peu, des options thérapeutiques du MPM ^{84,312}. Pour être efficace, cette thérapie est conditionnée par la présence d'un infiltrat lymphocytaire T CD8 dans le MPM. Or, chez les patients ayant un MPM, la composition de l'infiltrat immunitaire ainsi que l'expression de PDL1 sont très variables ^{82,101,102,292}. De plus, l'analyse en transcriptomique spatiale de deux biopsies de MPM suggère que les lymphocytes T et B sont exclus en périphérie de la tumeur à l'inverse des macrophages qui sont répartis dans toute la tumeur ³¹³.

Au vu des résultats obtenus dans cette étude et de l'induction par le MV d'une réponse inflammatoire nous émettons l'hypothèse que l'utilisation du MV permettrait de réchauffer le TME et améliorerait l'efficacité des IPCI dans le MPM. En effet l'induction de la réponse IFN-I établit un environnement pro-inflammatoire capable d'attirer les effecteurs immunitaires ^{141,306,307}. Il est d'ailleurs démontré que la réponse antitumorale engendrée par les IFN-I permet d'améliorer l'efficacité des traitements par IPCI ^{11,314,315}. De plus, les IFN-I induisent l'expression du point de contrôle immunitaire PD-L1 ^{179,316}. Dans les cocultures de notre étude, l'infection avec le MV augmente l'expression de PD-L1 par les cellules myéloïdes et les cellules tumorales et pourrait ainsi inhiber l'activité des lymphocytes T dans le TME. Cette augmentation de l'expression de PD-L1 suite à l'infection par le MV est également retrouvée dans le cancer ovarien ²⁷⁰ et le glioblastome ²⁷¹. Pour lever cette immunosuppression, l'utilisation du MV en combinaison avec des IPCI ciblant l'axe PD1/PDL-1 est étudiée. La synergie d'une combinaison d'anti-PD1 et d'un MV modifié pour être plus immunogène est montrée dans un modèle murin de glioblastome ²⁷². De même, la vectorisation d'un anti-PD1 dans le MV permet un afflux de lymphocytes T activés dans la tumeur des souris traitées et améliore significativement leur survie dans le modèle MC38 de cancer du côlon ²⁹⁷. Dans la mesure où dans les cocultures de MPM l'induction de la réponse IFN-I limite la production d'un transgène, cette dernière stratégie de vectorisation ne me paraît pas optimale chez l'homme.

En revanche, il pourrait être intéressant d'utiliser des IPCI en combinaison avec un MV modifié pour augmenter son immunogénicité. L'insertion d'une cytokine comme l'IL-12, qui agit localement à de faibles concentrations, est une piste prometteuse. Une autre stratégie consiste à utiliser le MVAC dont l'immunogénicité ne dépend pas de l'expression d'un transgène, mais se base sur l'absence d'expression de la protéine C virale qui permet normalement de limiter l'apparition de DI-RNA, de ralentir l'apoptose et de bloquer la réponse IFN-I. L'équipe a montré que ce virus réplique moins dans les cellules tumorales, induit une mort cellulaire plus rapide et est plus immunogène, car il forme davantage de DI-RNA qui stimulent la réponse IFN-I (manuscrit

en préparation). Un essai clinique de phase I/II de virothérapie antitumorale avec ce virus qui sera mené par le Dr Stéphane Champiat à l'Institut Gustave Roussy est prévu en 2025 pour le traitement de cinq cancers. Mes résultats suggèrent qu'il serait intéressant d'accompagner l'injection intratumorale du MVΔC avec un traitement par IPCI. Mes résultats suggèrent également que l'immunogénicité du MVΔC pourrait être limitée dans les cellules cancéreuses dépourvues des gènes IFN-I. Cependant, l'infection par ce virus peut déclencher la réponse IFN-I d'autres cellules du TME et ainsi améliorer la réponse immunitaire antitumorale.

Dans cette étude, je me suis intéressée aux cellules dérivées de monocytes, en particulier les macrophages et les DC, car ce sont les cellules immunitaires les plus fréquentes dans le TME du MPM. Cependant, d'autres cellules composent le TME et possèdent, elles aussi, une réponse IFN-I fonctionnelle. Des données préliminaires de ce projet montraient ainsi une diminution de la réplication virale dans la lignée Meso13 en présence de fibroblastes immortalisés (données non montrées). Cependant, ces mêmes fibroblastes cultivés avec une autre lignée tumorale permettaient à l'inverse une augmentation de la réplication virale. Cela suggère qu'un dialogue entre ces cellules favorise la réplication du virus. Ilkow et ses collaborateurs ont montré que les cellules tumorales, via la sécrétion de TGF- β , réduisent l'état antiviral des fibroblastes ³¹⁷. En retour, ceux-ci sécrètent du FGF2 qui diminue la reconnaissance des motifs viraux dans les cellules tumorales, potentialisant ainsi l'immunothérapie oncolytique. De plus, il est possible que les cellules du TME puissent servir de réservoir pour la réplication virale et délayer une seconde vague d'infection dans le TME. Les délétions homozygotes des gènes IFN-I sont retrouvées dans l'adénocarcinome pulmonaire qui est également permissif à la réplication du MV ⁹⁴. Il serait donc intéressant de regarder si les résultats obtenus dans les cocultures de MPM peuvent être étendus à ce cancer. De plus, l'équipe a accès à des biopsies d'adénocarcinome pulmonaire grâce à Elvire Pons-Tostivint qui dirige la recherche clinique en oncologie thoracique au CHU de Nantes. Ces biopsies mises en culture permettraient de reproduire fidèlement la modulation du TME lors d'une infection par le MV. Dans de telles biopsies, il serait également possible d'évaluer si, comme dans le glioblastome ²⁴⁷, une réponse IFN-I préexistante limite l'action du MV.

CONCLUSION

Les travaux de ma thèse montrent, dans un modèle humain, que le MV est capable de réorienter les cellules myéloïdes du TME immunosuppresseur vers un phénotype antiviral et pro-inflammatoire favorable à l'attraction d'effecteurs immunitaires et a une réponse antitumorale (Figure 13). Ils offrent une piste prometteuse pour améliorer la thérapie avec des IPCI dans le MPM. Ils mettent également en lumière que la production d'IFN-I au sein du TME peut limiter la réplication virale et la production de transgènes thérapeutiques par les virus armés. En regard de cette étude, il apparaît nécessaire de vectoriser des transgènes dont l'expression en grande quantité n'est pas un prérequis à leur action ou bien d'utiliser des stratégies d'inhibition de la réponse IFN-I, ciblées sur les cellules tumorales.

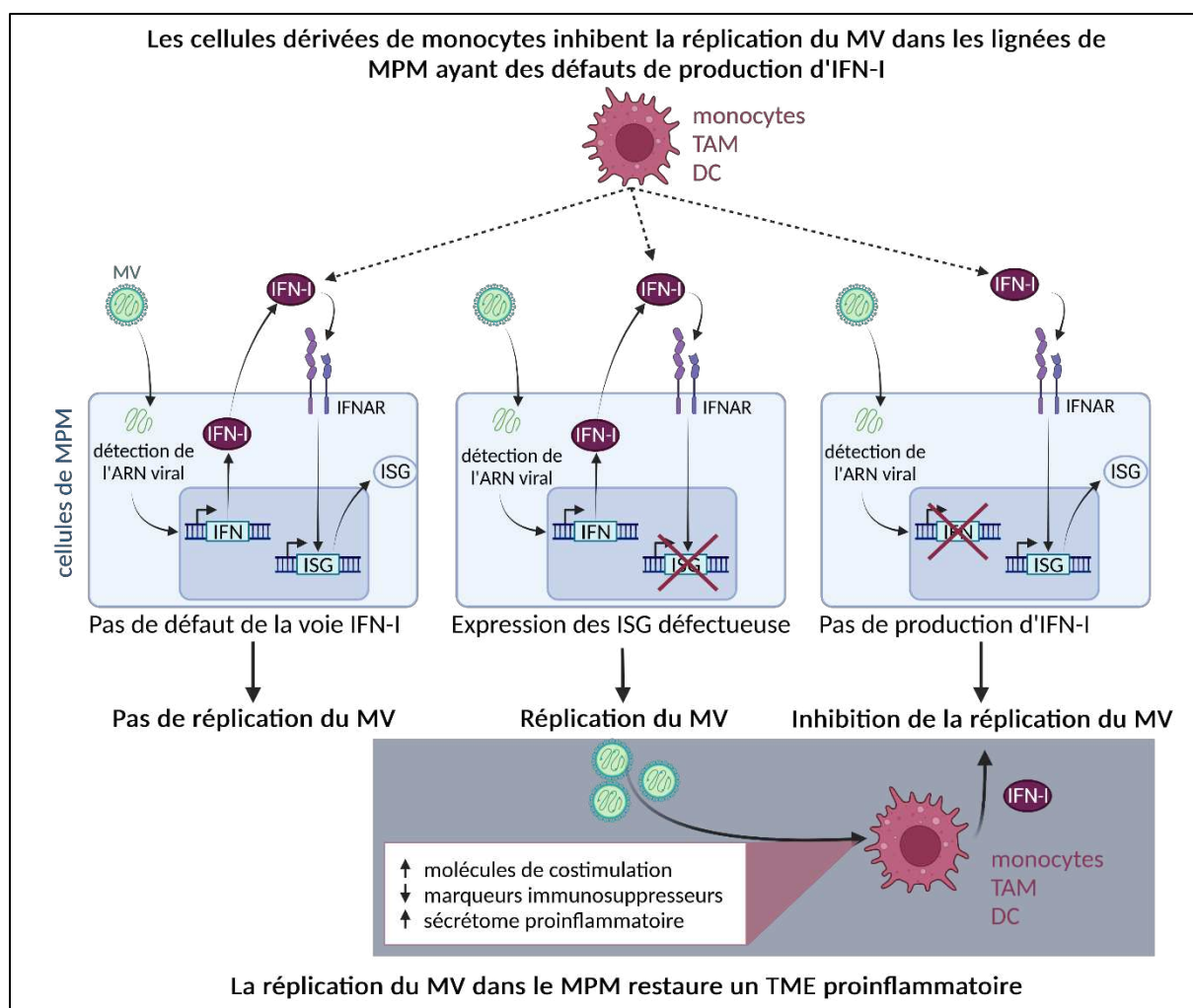


Figure 13 | Résumé graphique du travail de thèse.

BIBLIOGRAPHIE



1. Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* *12*, 31–46. 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
2. Klemm, F., Maas, R.R., Bowman, R.L., Kornete, M., Soukup, K., Nassiri, S., Brouland, J.-P., Iacobuzio-Donahue, C.A., Brennan, C., Tabar, V., et al. (2020). Interrogation of the Microenvironmental Landscape in Brain Tumors Reveals Disease-Specific Alterations of Immune Cells. *Cell* *181*, 1643–1660.e17. 10.1016/j.cell.2020.05.007.
3. Pan, D., and Jia, D. (2021). Application of Single-Cell Multi-Omics in Dissecting Cancer Cell Plasticity and Tumor Heterogeneity. *Front. Mol. Biosci.* *8*.
4. Schneider, G., Schmidt-Supprian, M., Rad, R., and Saur, D. (2017). Tissue-specific tumorigenesis: context matters. *Nat. Rev. Cancer* *17*, 239–253. 10.1038/nrc.2017.5.
5. Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *16*, 582–598. 10.1038/nrc.2016.73.
6. Grout, J.A., Sirven, P., Leader, A.M., Maskey, S., Hector, E., Puisieux, I., Steffan, F., Cheng, E., Tung, N., Maurin, M., et al. (2022). Spatial Positioning and Matrix Programs of Cancer-Associated Fibroblasts Promote T-cell Exclusion in Human Lung Tumors. *Cancer Discov.* *12*, 2606–2625. 10.1158/2159-8290.CD-21-1714.
7. de Visser, K.E., and Joyce, J.A. (2023). The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell* *41*, 374–403. 10.1016/j.ccell.2023.02.016.
8. Cox, T.R. (2021). The matrix in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *21*, 217–238. 10.1038/s41568-020-00329-7.
9. Gordon-Weeks, A., and Yuzhalin, A.E. (2020). Cancer Extracellular Matrix Proteins Regulate Tumour Immunity. *Cancers* *12*, 3331. 10.3390/cancers12113331.
10. Hernandez, C., Huebener, P., and Schwabe, R.F. (2016). Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword. *Oncogene* *35*, 5931–5941. 10.1038/onc.2016.104.
11. Grard, M., Chatelain, C., Delaunay, T., Pons-Tostivint, E., Bennouna, J., and Fonteneau, J.-F. (2021). Homozygous Co-Deletion of Type I Interferons and CDKN2A Genes in Thoracic Cancers: Potential Consequences for Therapy. *Front. Oncol.* *11*, 695770. 10.3389/fonc.2021.695770.
12. Veglia, F., Sanseviero, E., and Gabrilovich, D.I. (2021). Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nat. Rev. Immunol.* *21*, 485–498. 10.1038/s41577-020-00490-y.
13. Ma, R.-Y., Black, A., and Qian, B.-Z. (2022). Macrophage diversity in cancer revisited in the era of single-cell omics. *Trends Immunol.* *43*, 546–563. 10.1016/j.it.2022.04.008.
14. Olingy, C.E., Dinh, H.Q., and Hedrick, C.C. (2019). Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *J. Leukoc. Biol.* *106*, 309–322. 10.1002/JLB.4RI0818-311R.
15. Cheng, S., Li, Z., Gao, R., Xing, B., Gao, Y., Yang, Y., Qin, S., Zhang, L., Ouyang, H., Du, P., et al. (2021). A pan-cancer single-cell transcriptional atlas of tumor infiltrating myeloid cells. *Cell* *184*, 792–809.e23. 10.1016/j.cell.2021.01.010.
16. Coillard, A., and Segura, E. (2019). In vivo Differentiation of Human Monocytes. *Front. Immunol.* *10*, 1907. 10.3389/fimmu.2019.01907.

17. Ono, T., and Nakashima, T. (2018). Recent advances in osteoclast biology. *Histochem. Cell Biol.* *149*, 325–341. 10.1007/s00418-018-1636-2.
18. Canè, S., Ugel, S., Trovato, R., Marigo, I., De Sanctis, F., Sartoris, S., and Bronte, V. (2019). The Endless Saga of Monocyte Diversity. *Front. Immunol.* *10*, 1786. 10.3389/fimmu.2019.01786.
19. Chéné, A.-L., d'Almeida, S., Blondy, T., Tabiasco, J., Deshayes, S., Fonteneau, J.-F., Cellerin, L., Delneste, Y., Grégoire, M., and Blanquart, C. (2016). Pleural Effusions from Patients with Mesothelioma Induce Recruitment of Monocytes and Their Differentiation into M2 Macrophages. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* *11*, 1765–1773. 10.1016/j.jtho.2016.06.022.
20. Goudot, C., Coillard, A., Villani, A.-C., Gueguen, P., Cros, A., Sarkizova, S., Tang-Huau, T.-L., Bohec, M., Baulande, S., Hacohen, N., et al. (2017). Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages. *Immunity* *47*, 582–596.e6. 10.1016/j.immuni.2017.08.016.
21. Hoyos, Fontaine, Jacques, Heinen, Louis R, B, D., A, S., E, W., M, J., M, H., et al. (2022). HDAC Inhibition with Valproate Improves Direct Cytotoxicity of Monocytes against Mesothelioma Tumor Cells. *Cancers* *14*. 10.3390/cancers14092164.
22. Varol, C., Mildner, A., and Jung, S. (2015). Macrophages: development and tissue specialization. *Annu. Rev. Immunol.* *33*, 643–675. 10.1146/annurev-immunol-032414-112220.
23. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* *23*, 549–555. 10.1016/s1471-4906(02)02302-5.
24. Kloosterman, D.J., and Akkari, L. (2023). Macrophages at the interface of the co-evolving cancer ecosystem. *Cell* *186*, 1627–1651. 10.1016/j.cell.2023.02.020.
25. Güç, E., and Pollard, J.W. (2021). Redefining macrophage and neutrophil biology in the metastatic cascade. *Immunity* *54*, 885–902. 10.1016/j.immuni.2021.03.022.
26. Pittet, M.J., Michielin, O., and Migliorini, D. (2022). Clinical relevance of tumour-associated macrophages. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *19*, 402–421. 10.1038/s41571-022-00620-6.
27. Akkari, L., Bowman, R.L., Tessier, J., Klemm, F., Handgraaf, S.M., de Groot, M., Quail, D.F., Tillard, L., Gadiot, J., Huse, J.T., et al. (2020). Dynamic changes in glioma macrophage populations after radiotherapy reveal CSF-1R inhibition as a strategy to overcome resistance. *Sci. Transl. Med.* *12*, eaaw7843. 10.1126/scitranslmed.aaw7843.
28. Bejarano, L., Jordão, M.J.C., and Joyce, J.A. (2021). Therapeutic Targeting of the Tumor Microenvironment. *Cancer Discov.* *11*, 933–959. 10.1158/2159-8290.CD-20-1808.
29. Pyonteck, S.M., Akkari, L., Schuhmacher, A.J., Bowman, R.L., Sevenich, L., Quail, D.F., Olson, O.C., Quick, M.L., Huse, J.T., Teijeiro, V., et al. (2013). CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat. Med.* *19*, 1264–1272. 10.1038/nm.3337.
30. Salvagno, C., Ciampricotti, M., Tuit, S., Hau, C.-S., van Weverwijk, A., Coffelt, S.B., Kersten, K., Vrijland, K., Kos, K., Ulas, T., et al. (2019). Therapeutic targeting of macrophages enhances chemotherapy efficacy by unleashing type I interferon response. *Nat. Cell Biol.* *21*, 511–521. 10.1038/s41556-019-0298-1.

31. Steele, C.W., Karim, S.A., Leach, J.D.G., Bailey, P., Upstill-Goddard, R., Rishi, L., Foth, M., Bryson, S., McDaid, K., Wilson, Z., et al. (2016). CXCR2 Inhibition Profoundly Suppresses Metastases and Augments Immunotherapy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* 29, 832–845. 10.1016/j.ccell.2016.04.014.
32. Sun, L., Kees, T., Almeida, A.S., Liu, B., He, X.-Y., Ng, D., Han, X., Spector, D.L., McNeish, I.A., Gimotty, P., et al. (2021). Activating a collaborative innate-adaptive immune response to control metastasis. *Cancer Cell* 39, 1361–1374.e9. 10.1016/j.ccell.2021.08.005.
33. Chen, Y., Song, Y., Du, W., Gong, L., Chang, H., and Zou, Z. (2019). Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression. *J. Biomed. Sci.* 26, 78. 10.1186/s12929-019-0568-z.
34. Mantovani, A., Allavena, P., Marchesi, F., and Garlanda, C. (2022). Macrophages as tools and targets in cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 21, 799–820. 10.1038/s41573-022-00520-5.
35. Propper, D.J., and Balkwill, F.R. (2022). Harnessing cytokines and chemokines for cancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 19, 237–253. 10.1038/s41571-021-00588-9.
36. Chávez-Galán, L., Olleros, M.L., Vesin, D., and Garcia, I. (2015). Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169+ and TCR+ Macrophages. *Front. Immunol.* 6, 263. 10.3389/fimmu.2015.00263.
37. Mulder, K., Patel, A.A., Kong, W.T., Piot, C., Halitzki, E., Dunsmore, G., Khalilnezhad, S., Irac, S.E., Dubuisson, A., Chevrier, M., et al. (2021). Cross-tissue single-cell landscape of human monocytes and macrophages in health and disease. *Immunity* 54, 1883–1900.e5. 10.1016/j.immuni.2021.07.007.
38. Zilionis, R., Engblom, C., Pfirschke, C., Savova, V., Zemmour, D., Saatcioglu, H.D., Krishnan, I., Maroni, G., Meyerovitz, C.V., Kerwin, C.M., et al. (2019). Single-Cell Transcriptomics of Human and Mouse Lung Cancers Reveals Conserved Myeloid Populations across Individuals and Species. *Immunity* 50, 1317–1334.e10. 10.1016/j.immuni.2019.03.009.
39. Canli, Ö., Nicolas, A.M., Gupta, J., Finkelmeier, F., Goncharova, O., Pesic, M., Neumann, T., Horst, D., Löwer, M., Sahin, U., et al. (2017). Myeloid Cell-Derived Reactive Oxygen Species Induce Epithelial Mutagenesis. *Cancer Cell* 32, 869–883.e5. 10.1016/j.ccell.2017.11.004.
40. Greten, F.R., and Grivennikov, S.I. (2019). Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity* 51, 27–41. 10.1016/j.immuni.2019.06.025.
41. 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. 10.1158/0008-5472.CAN-04-1449.
42. Vitale, I., Manic, G., Coussens, L.M., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2019). Macrophages and Metabolism in the Tumor Microenvironment. *Cell Metab.* 30, 36–50. 10.1016/j.cmet.2019.06.001.
43. Srivastava, M.K., Sinha, P., Clements, V.K., Rodriguez, P., and Ostrand-Rosenberg, S. (2010). Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res.* 70, 68–77. 10.1158/0008-5472.CAN-09-2587.

44. Struckmeier, A.-K., Radermacher, A., Fehrenz, M., Bellin, T., Alansary, D., Wartenberg, P., Boehm, U., Wagner, M., Scheller, A., Hess, J., et al. (2023). IDO1 is highly expressed in macrophages of patients in advanced tumour stages of oral squamous cell carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *149*, 3623–3635. 10.1007/s00432-022-04277-7.
45. Ruffell, B., Chang-Strachan, D., Chan, V., Rosenbusch, A., Ho, C.M.T., Pryer, N., Daniel, D., Hwang, E.S., Rugo, H.S., and Coussens, L.M. (2014). Macrophage IL-10 Blocks CD8+ T Cell-Dependent Responses to Chemotherapy by Suppressing IL-12 Expression in Intratumoral Dendritic Cells. *Cancer Cell* *26*, 623–637. 10.1016/j.ccell.2014.09.006.
46. Tiwari, J.K., Negi, S., Kashyap, M., Nizamuddin, S., Singh, A., and Khattri, A. (2022). Pan-Cancer Analysis Shows Enrichment of Macrophages, Overexpression of Checkpoint Molecules, Inhibitory Cytokines, and Immune Exhaustion Signatures in EMT-High Tumors. *Front. Oncol.* *11*, 793881. 10.3389/fonc.2021.793881.
47. Gerhard, G.M., Bill, R., Messemaker, M., Klein, A.M., and Pittet, M.J. (2021). Tumor-infiltrating dendritic cell states are conserved across solid human cancers. *J. Exp. Med.* *218*, e20200264. 10.1084/jem.20200264.
48. Cabeza-Cabrerizo, M., Cardoso, A., Minutti, C.M., Pereira Da Costa, M., and Reis E Sousa, C. (2021). Dendritic Cells Revisited. *Annu. Rev. Immunol.* *39*, 131–166. 10.1146/annurev-immunol-061020-053707.
49. Wculek, S.K., Cueto, F.J., Mujal, A.M., Melero, I., Krummel, M.F., and Sancho, D. (2020). Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* *20*, 7–24. 10.1038/s41577-019-0210-z.
50. Reizis, B. (2019). Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. *Immunity* *50*, 37–50. 10.1016/j.immuni.2018.12.027.
51. Liu, Y.-J. (2005). IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 275–306. 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115633.
52. Guillerme, J.-B., Boisgerault, N., Roulois, D., Ménager, J., Combredet, C., Tangy, F., Fonteneau, J.-F., and Gregoire, M. (2013). Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *19*, 1147–1158. 10.1158/1078-0432.CCR-12-2733.
53. Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* *179*, 1109–1118. 10.1084/jem.179.4.1109.
54. Steinman, R.M. (2012). Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 1–22. 10.1146/annurev-immunol-100311-102839.
55. Chiba, S., Baghdadi, M., Akiba, H., Yoshiyama, H., Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H., Fujioka, Y., Ohba, Y., Gorman, J.V., Colgan, J.D., et al. (2012). Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. *Nat. Immunol.* *13*, 832–842. 10.1038/ni.2376.
56. Munn, D.H., and Mellor, A.L. (2016). IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance. *Trends Immunol.* *37*, 193–207. 10.1016/j.it.2016.01.002.

57. Philip, M., and Schietinger, A. (2022). CD8+ T cell differentiation and dysfunction in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 22, 209–223. 10.1038/s41577-021-00574-3.
58. Thommen, D.S., and Schumacher, T.N. (2018). T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell* 33, 547–562. 10.1016/j.ccell.2018.03.012.
59. Lanzavecchia, A. (1998). Licence to kill. *Nature* 393, 413–414. 10.1038/30845.
60. Borst, J., Ahrends, T., Bąbała, N., Melief, C.J.M., and Kastenmüller, W. (2018). CD4+ T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 635–647. 10.1038/s41577-018-0044-0.
61. Togashi, Y., Shitara, K., and Nishikawa, H. (2019). Regulatory T cells in cancer immunosuppression - implications for anticancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 16, 356–371. 10.1038/s41571-019-0175-7.
62. Chee, S.J., Lopez, M., Mellows, T., Gankande, S., Moutasim, K.A., Harris, S., Clarke, J., Vijayanand, P., Thomas, G.J., and Ottensmeier, C.H. (2017). Evaluating the effect of immune cells on the outcome of patients with mesothelioma. *Br. J. Cancer* 117, 1341–1348. 10.1038/bjc.2017.269.
63. Sharonov, G.V., Serebrovskaya, E.O., Yuzhakova, D.V., Britanova, O.V., and Chudakov, D.M. (2020). B cells, plasma cells and antibody repertoires in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 294–307. 10.1038/s41577-019-0257-x.
64. Ujiie, H., Kadota, K., Nitadori, J.-I., Aerts, J.G., Woo, K.M., Sima, C.S., Travis, W.D., Jones, D.R., Krug, L.M., and Adusumilli, P.S. (2015). The tumoral and stromal immune microenvironment in malignant pleural mesothelioma: A comprehensive analysis reveals prognostic immune markers. *Oncoimmunology* 4, e1009285. 10.1080/2162402X.2015.1009285.
65. Laumont, C.M., Banville, A.C., Gilardi, M., Hollern, D.P., and Nelson, B.H. (2022). Tumour-infiltrating B cells: immunological mechanisms, clinical impact and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* 22, 414–430. 10.1038/s41568-022-00466-1.
66. Yuen, G.J., Demissie, E., and Pillai, S. (2016). B lymphocytes and cancer: a love-hate relationship. *Trends Cancer* 2, 747–757. 10.1016/j.trecan.2016.10.010.
67. Chan, I.S., and Ewald, A.J. (2022). The changing role of natural killer cells in cancer metastasis. *J. Clin. Invest.* 132, e143762. 10.1172/JCI143762.
68. Donaldson, K., Murphy, F.A., Duffin, R., and Poland, C.A. (2010). Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. *Part. Fibre Toxicol.* 7, 5. 10.1186/1743-8977-7-5.
69. Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 329–360. 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803.
70. Bruni, D., Angell, H.K., and Galon, J. (2020). The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. *Nat. Rev. Cancer* 20, 662–680. 10.1038/s41568-020-0285-7.
71. Blank, C.U., Haining, W.N., Held, W., Hogan, P.G., Kallies, A., Lugli, E., Lynn, R.C., Philip, M., Rao, A., Restifo, N.P., et al. (2019). Defining “T cell exhaustion.” *Nat. Rev. Immunol.* 19, 665–674. 10.1038/s41577-019-0221-9.

72. Böttcher, J.P., Bonavita, E., Chakravarty, P., Blees, H., Cabeza-Cabrerizo, M., Sammiceli, S., Rogers, N.C., Sahai, E., Zelenay, S., and Reis e Sousa, C. (2018). NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell* 172, 1022-1037.e14. 10.1016/j.cell.2018.01.004.
73. Lavin, Y., Kobayashi, S., Leader, A., Amir, E.-A.D., Elefant, N., Bigenwald, C., Remark, R., Sweeney, R., Becker, C.D., Levine, J.H., et al. (2017). Innate Immune Landscape in Early Lung Adenocarcinoma by Paired Single-Cell Analyses. *Cell* 169, 750-765.e17. 10.1016/j.cell.2017.04.014.
74. Zheng, L., Qin, S., Si, W., Wang, A., Xing, B., Gao, R., Ren, X., Wang, L., Wu, X., Zhang, J., et al. (2021). Pan-cancer single-cell landscape of tumor-infiltrating T cells. *Science* 374, abe6474. 10.1126/science.abe6474.
75. Mascaux, C., Angelova, M., Vasaturo, A., Beane, J., Hijazi, K., Anthoine, G., Buttard, B., Rothe, F., Willard-Gallo, K., Haller, A., et al. (2019). Immune evasion before tumour invasion in early lung squamous carcinogenesis. *Nature* 571, 570–575. 10.1038/s41586-019-1330-0.
76. Anandasabapathy, N., Breton, G., Hurley, A., Caskey, M., Trumpfheller, C., Sarma, P., Pring, J., Pack, M., Buckley, N., Matei, I., et al. (2015). Efficacy and safety of CDX-301, recombinant human Flt3L, at expanding dendritic cells and hematopoietic stem cells in healthy human volunteers. *Bone Marrow Transplant.* 50, 924–930. 10.1038/bmt.2015.74.
77. Daud, A.I., Mirza, N., Lenox, B., Andrews, S., Urbas, P., Gao, G.X., Lee, J.-H., Sondak, V.K., Riker, A.I., Deconti, R.C., et al. (2008). Phenotypic and functional analysis of dendritic cells and clinical outcome in patients with high-risk melanoma treated with adjuvant granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 3235–3241. 10.1200/JCO.2007.13.9048.
78. Hong, I.-S. (2016). Stimulatory versus suppressive effects of GM-CSF on tumor progression in multiple cancer types. *Exp. Mol. Med.* 48, e242. 10.1038/emm.2016.64.
79. Yap, T.A., Aerts, J.G., Popat, S., and Fennell, D.A. (2017). Novel insights into mesothelioma biology and implications for therapy. *Nat. Rev. Cancer* 17, 475–488. 10.1038/nrc.2017.42.
80. Locatelli-Sanchez, M., Lantuejoul, S., Scherpereel, A., Zalcman, G., and Avrillon, V. (2023). Mésothéliome pleural 2023. Réf. Auvergne Rhône-Alpes En Oncol. Thorac.
81. Patel, S.C., and Dowell, J.E. (2016). Modern management of malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer Auckl. NZ* 7, 63–72. 10.2147/LCTT.S83338.
82. Fennell, D.A., Dulloo, S., and Harber, J. (2022). Immunotherapy approaches for malignant pleural mesothelioma. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 19, 573–584. 10.1038/s41571-022-00649-7.
83. Nicholson, A.G., Sauter, J.L., Nowak, A.K., Kindler, H.L., Gill, R.R., Remy-Jardin, M., Armato, S.G., Fernandez-Cuesta, L., Bueno, R., Alcalá, N., et al. (2020). EURACAN/IASLC Proposals for Updating the Histologic Classification of Pleural Mesothelioma: Towards a More Multidisciplinary Approach. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 15, 29–49. 10.1016/j.jtho.2019.08.2506.
84. Baas, P., Scherpereel, A., Nowak, A.K., Fujimoto, N., Peters, S., Tsao, A.S., Mansfield, A.S., Popat, S., Jahan, T., Antonia, S., et al. (2021). First-line nivolumab plus ipilimumab in unresectable malignant pleural mesothelioma (CheckMate 743): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Lond. Engl.* 397, 375–386. 10.1016/S0140-6736(20)32714-8.

85. Tsao, A.S., Pass, H.I., Rimner, A., and Mansfield, A.S. (2022). New Era for Malignant Pleural Mesothelioma: Updates on Therapeutic Options. *J. Clin. Oncol.* *40*, 681–692. 10.1200/JCO.21.01567.
86. Bott, M., Brevet, M., Taylor, B.S., Shimizu, S., Ito, T., Wang, L., Creaney, J., Lake, R.A., Zakowski, M.F., Reva, B., et al. (2011). The nuclear deubiquitinase BAP1 is commonly inactivated by somatic mutations and 3p21.1 losses in malignant pleural mesothelioma. *Nat. Genet.* *43*, 668–672. 10.1038/ng.855.
87. Bueno, R., Stawiski, E.W., Goldstein, L.D., Durinck, S., De Rienzo, A., Modrusan, Z., Gnad, F., Nguyen, T.T., Jaiswal, B.S., Chirieac, L.R., et al. (2016). Comprehensive genomic analysis of malignant pleural mesothelioma identifies recurrent mutations, gene fusions and splicing alterations. *Nat. Genet.* *48*, 407–416. 10.1038/ng.3520.
88. Guo, G., Chmielecki, J., Goparaju, C., Heguy, A., Dolgalev, I., Carbone, M., Seepo, S., Meyerson, M., and Pass, H.I. (2015). Whole-exome sequencing reveals frequent genetic alterations in BAP1, NF2, CDKN2A, and CUL1 in malignant pleural mesothelioma. *Cancer Res.* *75*, 264–269. 10.1158/0008-5472.CAN-14-1008.
89. Hida, T., Hamasaki, M., Matsumoto, S., Sato, A., Tsujimura, T., Kawahara, K., Iwasaki, A., Okamoto, T., Oda, Y., Honda, H., et al. (2017). Immunohistochemical detection of MTAP and BAP1 protein loss for mesothelioma diagnosis: Comparison with 9p21 FISH and BAP1 immunohistochemistry. *Lung Cancer* *104*, 98–105. 10.1016/j.lungcan.2016.12.017.
90. Cheng, J.Q., Jhanwar, S.C., Klein, W.M., Bell, D.W., Lee, W.C., Altomare, D.A., Nobori, T., Olopade, O.I., Buckler, A.J., and Testa, J.R. (1994). p16 alterations and deletion mapping of 9p21-p22 in malignant mesothelioma. *Cancer Res.* *54*, 5547–5551.
91. Marshall, K., Jackson, S., Jones, J., Holme, J., Lyons, J., Barrett, E., Taylor, P., Bishop, P., Hodgson, C., Green, M., et al. (2020). Homozygous deletion of CDKN2A in malignant mesothelioma: Diagnostic utility, patient characteristics and survival in a UK mesothelioma centre. *Lung Cancer Amst. Neth.* *150*, 195–200. 10.1016/j.lungcan.2020.10.020.
92. Kim, W.Y., and Sharpless, N.E. (2006). The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* *127*, 265–275. 10.1016/j.cell.2006.10.003.
93. Urso, L., Cavallari, I., Sharova, E., Ciccarese, F., Pasello, G., and Ciminale, V. (2020). Metabolic rewiring and redox alterations in malignant pleural mesothelioma. *Br. J. Cancer* *122*, 52–61. 10.1038/s41416-019-0661-9.
94. Delaunay, T., Achard, C., Boisgerault, N., Grard, M., Petithomme, T., Chatelain, C., Dutoit, S., Blanquart, C., Royer, P.-J., Minvielle, S., et al. (2020). Frequent Homozygous Deletions of Type I Interferon Genes in Pleural Mesothelioma Confer Sensitivity to Oncolytic Measles Virus. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* *15*, 827–842. 10.1016/j.jtho.2019.12.128.
95. Peng, Y., Chen, Y., Song, M., Zhang, X., Li, P., Yu, X., Huang, Y., Zhang, N., Ji, L., Xia, L., et al. (2022). Co-occurrence of CDKN2A/B and IFN-I homozygous deletions correlates with an immunosuppressive phenotype and poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Mol. Oncol.* *16*, 1746–1760. 10.1002/1878-0261.13206.
96. Hmeljak, J., Sanchez-Vega, F., Hoadley, K.A., Shih, J., Stewart, C., Heiman, D., Tarpey, P., Danilova, L., Drill, E., Gibb, E.A., et al. (2018). Integrative Molecular Characterization of Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancer Discov.* *8*, 1548–1565. 10.1158/2159-8290.CD-18-0804.

97. Petrilli, A.M., and Fernández-Valle, C. (2016). Role of Merlin/NF2 inactivation in tumor biology. *Oncogene* 35, 537–548. 10.1038/onc.2015.125.
98. Louie, B.H., and Kurzrock, R. (2020). BAP1: Not just a BRCA1-associated protein. *Cancer Treat. Rev.* 90, 102091. 10.1016/j.ctrv.2020.102091.
99. Foretová, L., Navrátilová, M., Svoboda, M., Házová, J., Vašíčková, P., Stáhlová, E.H., Fabian, P., Schneiderová, M., and Macháček, E. (2019). BAP1 Syndrome - Predisposition to Malignant Mesothelioma, Skin and Uveal Melanoma, Renal and Other Cancers. *Klin. Onkol. Cas. Ceske Slov. Onkol. Spolecnosti* 32, 118–122. 10.14735/amko2019S118.
100. Husain, A.N., Colby, T.V., Ordóñez, N.G., Allen, T.C., Attanoos, R.L., Beasley, M.B., Butnor, K.J., Chirieac, L.R., Churg, A.M., Dacic, S., et al. (2018). Guidelines for Pathologic Diagnosis of Malignant Mesothelioma 2017 Update of the Consensus Statement From the International Mesothelioma Interest Group. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 142, 89–108. 10.5858/arpa.2017-0124-RA.
101. Marcq, E., Siozopoulou, V., De Waele, J., van Audenaerde, J., Zwaenepoel, K., Santermans, E., Hens, N., Pauwels, P., van Meerbeeck, J.P., and Smits, E.L.J. (2017). Prognostic and predictive aspects of the tumor immune microenvironment and immune checkpoints in malignant pleural mesothelioma. *Oncoimmunology* 6, e1261241. 10.1080/2162402X.2016.1261241.
102. Klampatsa, A., O'Brien, S.M., Thompson, J.C., Rao, A.S., Stadanlick, J.E., Martinez, M.C., Liouisa, M., Cantu, E., Cengel, K., Moon, E.K., et al. (2019). Phenotypic and functional analysis of malignant mesothelioma tumor-infiltrating lymphocytes. *Oncoimmunology* 8, e1638211. 10.1080/2162402X.2019.1638211.
103. Vogl, M., Rosenmayr, A., Bohanes, T., Scheed, A., Brndiar, M., Stubenberger, E., and Ghanim, B. (2021). Biomarkers for Malignant Pleural Mesothelioma-A Novel View on Inflammation. *Cancers* 13, 658. 10.3390/cancers13040658.
104. Awad, M.M., Jones, R.E., Liu, H., Lizotte, P.H., Ivanova, E.V., Kulkarni, M., Herter-Sprrie, G.S., Liao, X., Santos, A.A., Bittinger, M.A., et al. (2016). Cytotoxic T Cells in PD-L1-Positive Malignant Pleural Mesotheliomas Are Counterbalanced by Distinct Immunosuppressive Factors. *Cancer Immunol. Res.* 4, 1038–1048. 10.1158/2326-6066.CIR-16-0171.
105. Alay, A., Cordero, D., Hijazo-Pechero, S., Aliagas, E., Lopez-Doriga, A., Marín, R., Palmero, R., Llatjós, R., Escobar, I., Ramos, R., et al. (2021). Integrative transcriptome analysis of malignant pleural mesothelioma reveals a clinically relevant immune-based classification. *J. Immunother. Cancer* 9, e001601. 10.1136/jitc-2020-001601.
106. Patil, N.S., Righi, L., Koeppen, H., Zou, W., Izzo, S., Grosso, F., Libener, R., Loiacono, M., Monica, V., Buttigliero, C., et al. (2018). Molecular and Histopathological Characterization of the Tumor Immune Microenvironment in Advanced Stage of Malignant Pleural Mesothelioma. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 13, 124–133. 10.1016/j.jtho.2017.09.1968.
107. Scherpereel, A., Grigoriu, B.D., Noppen, M., Gey, T., Chahine, B., Baldacci, S., Trauet, J., Copin, M.-C., Dessaint, J.-P., Porte, H., et al. (2013). Defect in recruiting effector memory CD8+ T-cells in malignant pleural effusions compared to normal pleural fluid. *BMC Cancer* 13, 324. 10.1186/1471-2407-13-324.
108. De Fonseca, D., Arnold, D.T., Morley, A.J., Brett, M., Bhatt, N., Edey, A., Daly, R., Bibby, A.C., and Maskell, N.A. (2022). Lymphocyte predominance in blood, pleural fluid, and tumour stroma;

- a prognostic marker in pleural mesothelioma. *BMC Pulm. Med.* 22, 173. 10.1186/s12890-022-01968-2.
109. Kishimoto, T., Fujimoto, N., Ebara, T., Omori, T., Oguri, T., Niimi, A., Yokoyama, T., Kato, M., Usami, I., Nishio, M., et al. (2019). Serum levels of the chemokine CCL2 are elevated in malignant pleural mesothelioma patients. *BMC Cancer* 19, 1204. 10.1186/s12885-019-6419-1.
 110. Burt, B.M., Rodig, S.J., Tilleman, T.R., Elbardissi, A.W., Bueno, R., and Sugarbaker, D.J. (2011). Circulating and tumor-infiltrating myeloid cells predict survival in human pleural mesothelioma. *Cancer* 117, 5234–5244. 10.1002/cncr.26143.
 111. Blondy, T., d'Almeida, S.M., Briolay, T., Tabiasco, J., Meiller, C., Chéné, A.-L., Cellierin, L., Deshayes, S., Delneste, Y., Fonteneau, J.-F., et al. (2020). Involvement of the M-CSF/IL-34/CSF-1R pathway in malignant pleural mesothelioma. *J. Immunother. Cancer* 8, e000182. 10.1136/jitc-2019-000182.
 112. Lievense, L.A., Cornelissen, R., Bezemer, K., Kaijen-Lambers, M.E.H., Hegmans, J.P.J.J., and Aerts, J.G.J.V. (2016). Pleural Effusion of Patients with Malignant Mesothelioma Induces Macrophage-Mediated T Cell Suppression. *J. Thorac. Oncol.* 11, 1755–1764. 10.1016/j.jtho.2016.06.021.
 113. Pasello, G., Zago, G., Lunardi, F., Urso, L., Kern, I., Vlacic, G., Grosso, F., Mencoboni, M., Ceresoli, G.L., Schiavon, M., et al. (2018). Malignant pleural mesothelioma immune microenvironment and checkpoint expression: correlation with clinical-pathological features and intratumor heterogeneity over time. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 29, 1258–1265. 10.1093/annonc/mdy086.
 114. Wu, L., Kohno, M., Murakami, J., Zia, A., Allen, J., Yun, H., Chan, M., Baciuc, C., Liu, M., Serre-Beinier, V., et al. (2023). Defining and targeting tumor-associated macrophages in malignant mesothelioma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 120, e2210836120. 10.1073/pnas.2210836120.
 115. Nelson, D.B., Rice, D.C., Niu, J., Atay, S., Vaporciyan, A.A., Antonoff, M., Hofstetter, W.L., Walsh, G.L., Swisher, S.G., Roth, J.A., et al. (2017). Long-Term Survival Outcomes of Cancer-Directed Surgery for Malignant Pleural Mesothelioma: Propensity Score Matching Analysis. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 35, 3354–3362. 10.1200/JCO.2017.73.8401.
 116. Vogelzang, N.J., Rusthoven, J.J., Symanowski, J., Denham, C., Kaukel, E., Ruffie, P., Gatzemeier, U., Boyer, M., Emri, S., Manegold, C., et al. (2023). Phase III Study of Pemetrexed in Combination With Cisplatin Versus Cisplatin Alone in Patients With Malignant Pleural Mesothelioma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 41, 2125–2133. 10.1200/JCO.22.02542.
 117. Shalhout, S.Z., Miller, D.M., Emerick, K.S., and Kaufman, H.L. (2023). Therapy with oncolytic viruses: progress and challenges. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 20, 160–177. 10.1038/s41571-022-00719-w.
 118. Petithomme, T., Grard, M., Fonteneau, J.-F., and Boisgerault, N. (2020). [The yellow fever vaccine as a new cancer treatment?]. *Med. Sci. MS* 36, 1216–1217. 10.1051/medsci/2020236.
 119. Kelly, E., and Russell, S.J. (2007). History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 15, 651–659. 10.1038/sj.mt.6300108.

120. Wheelock, E.F., and Dingle, J.H. (1964). OBSERVATIONS ON THE REPEATED ADMINISTRATION OF VIRUSES TO A PATIENT WITH ACUTE LEUKEMIA. A PRELIMINARY REPORT. *N. Engl. J. Med.* *271*, 645–651. 10.1056/NEJM196409242711302.
121. Zygiert, Z. (1971). Hodgkin's disease: remissions after measles. *Lancet Lond. Engl.* *1*, 593. 10.1016/s0140-6736(71)91186-x.
122. Achard, C., Surendran, A., Wedge, M.-E., Ungerechts, G., Bell, J., and Ilkow, C.S. (2018). Lighting a Fire in the Tumor Microenvironment Using Oncolytic Immunotherapy. *EBioMedicine* *31*, 17–24. 10.1016/j.ebiom.2018.04.020.
123. Lin, D., Shen, Y., and Liang, T. (2023). Oncolytic virotherapy: basic principles, recent advances and future directions. *Signal Transduct. Target. Ther.* *8*, 1–29. 10.1038/s41392-023-01407-6.
124. Bommareddy, P.K., Shettigar, M., and Kaufman, H.L. (2018). Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* *18*, 498–513. 10.1038/s41577-018-0014-6.
125. Anderson, B.D., Nakamura, T., Russell, S.J., and Peng, K.-W. (2004). High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus. *Cancer Res.* *64*, 4919–4926. 10.1158/0008-5472.CAN-04-0884.
126. Dörig, R.E., Marcil, A., Chopra, A., and Richardson, C.D. (1993). The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* *75*, 295–305. 10.1016/0092-8674(93)80071-l.
127. Lok, A., Descamps, G., Tessoulin, B., Chiron, D., Eveillard, M., Godon, C., Le Bris, Y., Vabret, A., Bellanger, C., Maillet, L., et al. (2018). p53 regulates CD46 expression and measles virus infection in myeloma cells. *Blood Adv.* *2*, 3492–3505. 10.1182/bloodadvances.2018025106.
128. Hanauer, J.R.H., Koch, V., Lauer, U.M., and Mühlebach, M.D. (2019). High-Affinity DARPIn Allows Targeting of MeV to Glioblastoma Multiforme in Combination with Protease Targeting without Loss of Potency. *Mol. Ther. Oncolytics* *15*, 186–200. 10.1016/j.omto.2019.10.004.
129. Puig-Saus, C., Rojas, L.A., Laborda, E., Figueras, A., Alba, R., Fillat, C., and Alemany, R. (2014). iRGD tumor-penetrating peptide-modified oncolytic adenovirus shows enhanced tumor transduction, intratumoral dissemination and antitumor efficacy. *Gene Ther.* *21*, 767–774. 10.1038/gt.2014.52.
130. 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. J. Am. Soc. Gene Ther.* *14*, 361–370. 10.1016/j.ymthe.2006.05.008.
131. Irving, J., Wang, Z., Powell, S., O'Sullivan, C., Mok, M., Murphy, B., Cardoza, L., Lebkowski, J.S., and Majumdar, A.S. (2004). Conditionally replicative adenovirus driven by the human telomerase promoter provides broad-spectrum antitumor activity without liver toxicity. *Cancer Gene Ther.* *11*, 174–185. 10.1038/sj.cgt.7700666.
132. Leber, M.F., Baertsch, M.-A., Anker, S.C., Henkel, L., Singh, H.M., Bossow, S., Engeland, C.E., Barkley, R., Hoyler, B., Albert, J., et al. (2018). Enhanced Control of Oncolytic Measles Virus Using MicroRNA Target Sites. *Mol. Ther. Oncolytics* *9*, 30–40. 10.1016/j.omto.2018.04.002.

133. Cascallo, M., Alonso, M.M., Rojas, J.J., Perez-Gimenez, A., Fueyo, J., and Alemany, R. (2007). Systemic toxicity-efficacy profile of ICOVIR-5, a potent and selective oncolytic adenovirus based on the pRB pathway. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *15*, 1607–1615. 10.1038/sj.mt.6300239.
134. Koch, J., Schober, S.J., Hindupur, S.V., Schöning, C., Klein, F.G., Mantwill, K., Ehrenfeld, M., Schillinger, U., Hohnecker, T., Qi, P., et al. (2022). Targeting the Retinoblastoma/E2F repressive complex by CDK4/6 inhibitors amplifies oncolytic potency of an oncolytic adenovirus. *Nat. Commun.* *13*, 4689. 10.1038/s41467-022-32087-5.
135. Ma, J., He, X., Wang, W., Huang, Y., Chen, L., Cong, W., Gu, J., Hu, H., Shi, J., Li, L., et al. (2009). E2F promoter-regulated oncolytic adenovirus with p16 gene induces cell apoptosis and exerts antitumor effect on gastric cancer. *Dig. Dis. Sci.* *54*, 1425–1431. 10.1007/s10620-008-0543-0.
136. Rojas, J.J., Cascallo, M., Guedan, S., Gros, A., Martinez-Quintanilla, J., Hemminki, A., and Alemany, R. (2009). A modified E2F-1 promoter improves the efficacy to toxicity ratio of oncolytic adenoviruses. *Gene Ther.* *16*, 1441–1451. 10.1038/gt.2009.103.
137. Jacobson, B.A., Sadiq, A.A., Tang, S., Jay-Dixon, J., Patel, M.R., Drees, J., Sorenson, B.S., Russell, S.J., and Kratzke, R.A. (2017). Cap-dependent translational control of oncolytic measles virus infection in malignant mesothelioma. *Oncotarget* *8*, 63096–63109. 10.18632/oncotarget.18656.
138. Garber, K. (2006). China Approves World's First Oncolytic Virus Therapy For Cancer Treatment. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* *98*, 298–300. 10.1093/jnci/djj111.
139. Boisgerault, N., Guillerme, J.-B., Pouliquen, D., Mesel-Lemoine, M., Achard, C., Combredet, C., Fonteneau, J.-F., Tangy, F., and Grégoire, M. (2013). Natural oncolytic activity of live-attenuated measles virus against human lung and colorectal adenocarcinomas. *BioMed Res. Int.* *2013*, 387362. 10.1155/2013/387362.
140. Patel, B., Dey, A., Ghorani, E., Kumar, S., Malam, Y., Rai, L., Steele, A.J., Thomson, J., Wickremasinghe, R.G., Zhang, Y., et al. (2011). Differential cytopathology and kinetics of measles oncolysis in two primary B-cell malignancies provides mechanistic insights. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *19*, 1034–1040. 10.1038/mt.2011.44.
141. Zitvogel, L., Galluzzi, L., Kepp, O., Smyth, M.J., and Kroemer, G. (2015). Type I interferons in anticancer immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 405–414. 10.1038/nri3845.
142. Achard, C., Boisgerault, N., Delaunay, T., Roulois, D., Nedellec, S., Royer, P.-J., Pain, M., Combredet, C., Mesel-Lemoine, M., Cellerin, L., et al. (2015). Sensitivity of human pleural mesothelioma to oncolytic measles virus depends on defects of the type I interferon response. *Oncotarget* *6*, 44892–44904. 10.18632/oncotarget.6285.
143. 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. 10.1016/s1535-6108(03)00241-1.
144. Schneider, W.M., Chevillotte, M.D., and Rice, C.M. (2014). Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu. Rev. Immunol.* *32*, 513–545. 10.1146/annurev-immunol-032713-120231.

145. Hoffmann, H.-H., Schneider, W.M., and Rice, C.M. (2015). Interferons and viruses: an evolutionary arms race of molecular interactions. *Trends Immunol.* **36**, 124–138. 10.1016/j.it.2015.01.004.
146. Achard, C., Guillerme, J.-B., Bruni, D., Boisgerault, N., Combredet, C., Tangy, F., Jouvenet, N., Grégoire, M., and Fonteneau, J.-F. (2017). Oncolytic measles virus induces tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated cytotoxicity by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Oncoimmunology* **6**, e1261240. 10.1080/2162402X.2016.1261240.
147. Ikegame, S., Takeda, M., Ohno, S., Nakatsu, Y., Nakanishi, Y., and Yanagi, Y. (2010). Both RIG-I and MDA5 RNA helicases contribute to the induction of alpha/beta interferon in measles virus-infected human cells. *J. Virol.* **84**, 372–379. 10.1128/JVI.01690-09.
148. Mura, M., Combredet, C., Najburg, V., Sanchez David, R.Y., Tangy, F., and Komarova, A.V. (2017). Nonencapsidated 5' Copy-Back Defective Interfering Genomes Produced by Recombinant Measles Viruses Are Recognized by RIG-I and LGP2 but Not MDA5. *J. Virol.* **91**, e00643-17. 10.1128/JVI.00643-17.
149. Runge, S., Sparrer, K.M.J., Lässig, C., Hembach, K., Baum, A., García-Sastre, A., Söding, J., Conzelmann, K.-K., and Hopfner, K.-P. (2014). In vivo ligands of MDA5 and RIG-I in measles virus-infected cells. *PLoS Pathog.* **10**, e1004081. 10.1371/journal.ppat.1004081.
150. Sanchez David, R.Y., Combredet, C., Sismeiro, O., Dillies, M.-A., Jagla, B., Coppée, J.-Y., Mura, M., Guerbois Galla, M., Despres, P., Tangy, F., et al. (2016). Comparative analysis of viral RNA signatures on different RIG-I-like receptors. *eLife* **5**, e11275. 10.7554/eLife.11275.
151. Ayasoufi, K., and Pfaller, C.K. (2020). Seek and hide: the manipulating interplay of measles virus with the innate immune system. *Curr. Opin. Virol.* **41**, 18–30. 10.1016/j.coviro.2020.03.001.
152. Bieback, K., Lien, E., Klagge, I.M., Avota, E., Schneider-Schaulies, J., Duprex, W.P., Wagner, H., Kirschning, C.J., Ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, S. (2002). Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J. Virol.* **76**, 8729–8736. 10.1128/jvi.76.17.8729-8736.2002.
153. Sato, M., Hata, N., Asagiri, M., Nakaya, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (1998). Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett.* **441**, 106–110. 10.1016/S0014-5793(98)01514-2.
154. Lazear, H.M., Schoggins, J.W., and Diamond, M.S. (2019). Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity* **50**, 907–923. 10.1016/j.immuni.2019.03.025.
155. Am, G., Cj, W., and Daa, V. (2022). Interferon-γ: teammate or opponent in the tumour microenvironment? *Nat. Rev. Immunol.* **22**. 10.1038/s41577-021-00566-3.
156. Sun, S., Frontini, F., Qi, W., Hariharan, A., Ronner, M., Wipplinger, M., Blanquart, C., Rehrauer, H., Fonteneau, J.-F., and Felley-Bosco, E. (2021). Endogenous retrovirus expression activates type-I interferon signaling in an experimental mouse model of mesothelioma development. *Cancer Lett.* **507**, 26–38. 10.1016/j.canlet.2021.03.004.
157. Sun, S., Qi, W., Rehrauer, H., Ronner, M., Hariharan, A., Wipplinger, M., Meiller, C., Stahel, R., Früh, M., Cerciello, F., et al. (2022). Viral Mimicry Response Is Associated With Clinical Outcome in Pleural Mesothelioma. *JTO Clin. Res. Rep.* **3**, 100430. 10.1016/j.jtocrr.2022.100430.

158. Kwon, J., and Bakhoun, S.F. (2020). The cytosolic DNA-sensing cGAS-STING pathway in cancer. *Cancer Discov.* *10*, 26–39. 10.1158/2159-8290.CD-19-0761.
159. Woo, S.-R., Fuertes, M.B., Corrales, L., Spranger, S., Furdyna, M.J., Leung, M.Y.K., Duggan, R., Wang, Y., Barber, G.N., Fitzgerald, K.A., et al. (2014). STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors. *Immunity* *41*, 830–842. 10.1016/j.immuni.2014.10.017.
160. Bidwell, B.N., Slaney, C.Y., Withana, N.P., Forster, S., Cao, Y., Loi, S., Andrews, D., Mikeska, T., Mangan, N.E., Samarajiwa, S.A., et al. (2012). Silencing of Irf7 pathways in breast cancer cells promotes bone metastasis through immune escape. *Nat. Med.* *18*, 1224–1231. 10.1038/nm.2830.
161. Chen, H.-M., Tanaka, N., Mitani, Y., Oda, E., Nozawa, H., Chen, J.-Z., Yanai, H., Negishi, H., Choi, M.K., Iwasaki, T., et al. (2009). Critical role for constitutive type I interferon signaling in the prevention of cellular transformation. *Cancer Sci.* *100*, 449–456. 10.1111/j.1349-7006.2008.01051.x.
162. Swann, J.B., Hayakawa, Y., Zerafa, N., Sheehan, K.C.F., Scott, B., Schreiber, R.D., Hertzog, P., and Smyth, M.J. (2007). Type I IFN contributes to NK cell homeostasis, activation, and antitumor function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 7540–7549. 10.4049/jimmunol.178.12.7540.
163. Tschurtschenthaler, M., Wang, J., Fricke, C., Fritz, T.M.J., Niederreiter, L., Adolph, T.E., Sarcevic, E., Künzel, S., Offner, F.A., Kalinke, U., et al. (2014). Type I interferon signalling in the intestinal epithelium affects Paneth cells, microbial ecology and epithelial regeneration. *Gut* *63*, 1921–1931. 10.1136/gutjnl-2013-305863.
164. Cairns, P., Tokino, K., Eby, Y., and Sidransky, D. (1994). Homozygous deletions of 9p21 in primary human bladder tumors detected by comparative multiplex polymerase chain reaction. *Cancer Res.* *54*, 1422–1424.
165. Diaz, M.O., Rubin, C.M., Harden, A., Ziemien, S., Larson, R.A., Le Beau, M.M., and Rowley, J.D. (1990). Deletions of interferon genes in acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* *322*, 77–82. 10.1056/NEJM199001113220202.
166. Olopade, O.I., Buchhagen, D.L., Malik, K., Sherman, J., Nobori, T., Bader, S., Nau, M.M., Gazdar, A.F., Minna, J.D., and Diaz, M.O. (1993). Homozygous loss of the interferon genes defines the critical region on 9p that is deleted in lung cancers. *Cancer Res.* *53*, 2410–2415.
167. Barriga, F.M., Tsanov, K.M., Ho, Y.-J., Sohail, N., Zhang, A., Baslan, T., Wuest, A.N., Del Priore, I., Meškauskaitė, B., Livshits, G., et al. (2022). MACHETE identifies interferon-encompassing chromosome 9p21.3 deletions as mediators of immune evasion and metastasis. *Nat. Cancer* *3*, 1367–1385. 10.1038/s43018-022-00443-5.
168. Xia, T., Konno, H., and Barber, G.N. (2016). Recurrent Loss of STING Signaling in Melanoma Correlates with Susceptibility to Viral Oncolysis. *Cancer Res.* *76*, 6747–6759. 10.1158/0008-5472.CAN-16-1404.
169. Xia, T., Konno, H., Ahn, J., and Barber, G.N. (2016). Deregulation of STING Signaling in Colorectal Carcinoma Constrains DNA Damage Responses and Correlates With Tumorigenesis. *Cell Rep.* *14*, 282–297. 10.1016/j.celrep.2015.12.029.
170. Adámková, L., Soucková, K., and Kovářik, J. (2007). Transcription protein STAT1: biology and relation to cancer. *Folia Biol. (Praha)* *53*, 1–6.

171. Saloura, V., Wang, L.-C.S., Fridlender, Z.G., Sun, J., Cheng, G., Kapoor, V., Sterman, D.H., Harty, R.N., Okumura, A., Barber, G.N., et al. (2010). Evaluation of an attenuated vesicular stomatitis virus vector expressing interferon-beta for use in malignant pleural mesothelioma: heterogeneity in interferon responsiveness defines potential efficacy. *Hum. Gene Ther.* 21, 51–64. 10.1089/hum.2009.088.
172. Marozin, S., Altomonte, J., Stadler, F., Thasler, W.E., Schmid, R.M., and Ebert, O. (2008). Inhibition of the IFN- β Response in Hepatocellular Carcinoma by Alternative Spliced Isoform of IFN Regulatory Factor-3. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 16, 1789–1797. 10.1038/mt.2008.201.
173. Fernandes, J. (2016). Oncogenes: The Passport for Viral Oncolysis Through PKR Inhibition. *Biomark. Cancer* 8, 101–110. 10.4137/BIC.S33378.
174. van Weverwijk, A., and de Visser, K.E. (2023). Mechanisms driving the immunoregulatory function of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* 23, 193–215. 10.1038/s41568-022-00544-4.
175. 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. 10.1038/77558.
176. Cruz, F.M., Colbert, J.D., Merino, E., Kriegsman, B.A., and Rock, K.L. (2017). The Biology and Underlying Mechanisms of Cross-Presentation of Exogenous Antigens on MHC-I Molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 35, 149–176. 10.1146/annurev-immunol-041015-055254.
177. Pol, J.G., Workenhe, S.T., Konda, P., Gujar, S., and Kroemer, G. (2020). Cytokines in oncolytic virotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 56, 4–27. 10.1016/j.cytogfr.2020.10.007.
178. Mealiea, D., and McCart, J.A. (2022). Cutting both ways: the innate immune response to oncolytic virotherapy. *Cancer Gene Ther.* 29, 629–646. 10.1038/s41417-021-00351-3.
179. Zamarin, D., Ricca, J.M., Sadekova, S., Oseledchyk, A., Yu, Y., Blumenschein, W.M., Wong, J., Gigoux, M., Merghoub, T., and Wolchok, J.D. PD-L1 in tumor microenvironment mediates resistance to oncolytic immunotherapy. *J. Clin. Invest.* 128, 1413–1428. 10.1172/JCI98047.
180. Errington, F., Steele, L., Prestwich, R., Harrington, K.J., Pandha, H.S., Vidal, L., de Bono, J., Selby, P., Coffey, M., Vile, R., et al. (2008). Reovirus Activates Human Dendritic Cells to Promote Innate Antitumor Immunity¹. *J. Immunol.* 180, 6018–6026. 10.4049/jimmunol.180.9.6018.
181. Donnelly, O.G., Errington-Mais, F., Steele, L., Hadac, E., Jennings, V., Scott, K., Peach, H., Phillips, R.M., Bond, J., Pandha, H., et al. (2013). Measles virus causes immunogenic cell death in human melanoma. *Gene Ther.* 20, 7–15. 10.1038/gt.2011.205.
182. Gauvrit, A., Brandler, S., Sapede-Pero, C., Boisgerault, N., Tangy, F., and Gregoire, M. (2008). Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response. *Cancer Res.* 68, 4882–4892. 10.1158/0008-5472.CAN-07-6265.
183. Moehler, M.H., Zeidler, M., Wilsberg, V., Cornelis, J.J., Woelfel, T., Rommelaere, J., Galle, P.R., and Heike, M. (2005). Parvovirus H-1-induced tumor cell death enhances human immune response in vitro via increased phagocytosis, maturation, and cross-presentation by dendritic cells. *Hum. Gene Ther.* 16, 996–1005. 10.1089/hum.2005.16.996.

184. Lemos de Matos, A., Franco, L.S., and McFadden, G. (2020). Oncolytic Viruses and the Immune System: The Dynamic Duo. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 17, 349–358. 10.1016/j.omtm.2020.01.001.
185. Delaunay, T., Violland, M., Boisgerault, N., Dutoit, S., Vignard, V., Münz, C., Gannage, M., Dréno, B., Vaivode, K., Pjanova, D., et al. (2018). Oncolytic viruses sensitize human tumor cells for NY-ESO-1 tumor antigen recognition by CD4+ effector T cells. *Oncoimmunology* 7, e1407897. 10.1080/2162402X.2017.1407897.
186. Francis, L., Guo, Z.S., Liu, Z., Ravindranathan, R., Urban, J.A., Sathaiah, M., Magge, D., Kalinski, P., and Bartlett, D.L. (2016). Modulation of chemokines in the tumor microenvironment enhances oncolytic virotherapy for colorectal cancer. *Oncotarget* 7, 22174–22185. 10.18632/oncotarget.7907.
187. Hedberg, J., Studebaker, A., Smith, L., Chen, C.-Y., Westfall, J.J., Cam, M., Gross, A., Hernandez-Aguirre, I., Martin, A., Kim, D., et al. (2023). Oncolytic virus-driven immune remodeling revealed in mouse medulloblastomas at single cell resolution. *Mol. Ther. Oncolytics* 30, 39–55. 10.1016/j.omto.2023.07.006.
188. Tan, D.Q., Zhang, L., Ohba, K., Ye, M., Ichiyama, K., and Yamamoto, N. (2016). Macrophage response to oncolytic paramyxoviruses potentiates virus-mediated tumor cell killing. *Eur. J. Immunol.* 46, 919–928. 10.1002/eji.201545915.
189. Ribas, A., Dummer, R., Puzanov, I., VanderWalde, A., Andtbacka, R.H.I., Michielin, O., Olszanski, A.J., Malvehy, J., Cebon, J., Fernandez, E., et al. (2017). Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy. *Cell* 170, 1109–1119.e10. 10.1016/j.cell.2017.08.027.
190. Samson, A., West, E.J., Carmichael, J., Scott, K.J., Turnbull, S., Kuszlewicz, B., Dave, R.V., Peckham-Cooper, A., Tidswell, E., Kingston, J., et al. (2022). Neoadjuvant Intravenous Oncolytic Vaccinia Virus Therapy Promotes Anticancer Immunity in Patients. *Cancer Immunol. Res.* 10, 745–756. 10.1158/2326-6066.CIR-21-0171.
191. 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. 10.1158/0008-5472.CAN-06-3974.
192. Prestwich, R.J., Errington, F., Ilett, E.J., Morgan, R.S.M., Scott, K.J., Kottke, T., Thompson, J., Morrison, E.E., Harrington, K.J., Pandha, H.S., et al. (2008). Tumor infection by oncolytic reovirus primes adaptive antitumor immunity. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 7358–7366. 10.1158/1078-0432.CCR-08-0831.
193. Dey, A., Zhang, Y., Castleton, A.Z., Bailey, K., Beaton, B., Patel, B., and Fielding, A.K. (2016). The Role of Neutrophils in Measles Virus-mediated Oncolysis Differs Between B-cell Malignancies and Is Not Always Enhanced by GCSF. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 24, 184–192. 10.1038/mt.2015.149.
194. Naumenko, V., Rajwani, J., Turk, M., Zhang, C., Tse, M., Davis, R.P., Kim, D., Rakic, A., Dastidar, H., Van, S., et al. (2022). Repeated dosing improves oncolytic rhabdovirus therapy in mice via interactions with intravascular monocytes. *Commun. Biol.* 5, 1385. 10.1038/s42003-022-04254-3.
195. Engeland, C.E., and Ungerechts, G. (2021). Measles Virus as an Oncolytic Immunotherapy. *Cancers* 13, 544. 10.3390/cancers13030544.

196. Grard, M., Idjellidaine, M., Arbabian, A., Chatelain, C., Berland, L., Combredet, C., Dutoit, S., Deshayes, S., Dehame, V., Labarrière, N., et al. (2023). Oncolytic attenuated measles virus encoding NY-ESO-1 induces HLA I and II presentation of this tumor antigen by melanoma and dendritic cells. *Cancer Immunol. Immunother.* CII. 10.1007/s00262-023-03486-4.
197. Liu, B.L., Robinson, M., Han, Z.-Q., Branston, R.H., English, C., Reay, P., McGrath, Y., Thomas, S.K., Thornton, M., Bullock, P., et al. (2003). ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. *Gene Ther.* 10, 292–303. 10.1038/sj.gt.3301885.
198. Todo, T., Ito, H., Ino, Y., Ohtsu, H., Ota, Y., Shibahara, J., and Tanaka, M. (2022). Intratumoral oncolytic herpes virus G47 Δ for residual or recurrent glioblastoma: a phase 2 trial. *Nat. Med.* 28, 1630–1639. 10.1038/s41591-022-01897-x.
199. Harrington, K., Freeman, D.J., Kelly, B., Harper, J., and Soria, J.-C. (2019). Optimizing oncolytic virotherapy in cancer treatment. *Nat. Rev. Drug Discov.* 18, 689–706. 10.1038/s41573-019-0029-0.
200. Andtbacka, R.H.I., Collichio, F., Harrington, K.J., Middleton, M.R., Downey, G., Öhrling, K., and Kaufman, H.L. (2019). Final analyses of OPTiM: a randomized phase III trial of talimogene laherparepvec versus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in unresectable stage III-IV melanoma. *J. Immunother. Cancer* 7, 145. 10.1186/s40425-019-0623-z.
201. Andtbacka, R.H.I., Kaufman, H.L., Collichio, F., Amatruda, T., Senzer, N., Chesney, J., Delman, K.A., Spitler, L.E., Puzanov, I., Agarwala, S.S., et al. (2015). Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 33, 2780–2788. 10.1200/JCO.2014.58.3377.
202. Andtbacka, R.H.I., Ross, M., Puzanov, I., Milhem, M., Collichio, F., Delman, K.A., Amatruda, T., Zager, J.S., Cranmer, L., Hsueh, E., et al. (2016). Patterns of Clinical Response with Talimogene Laherparepvec (T-VEC) in Patients with Melanoma Treated in the OPTiM Phase III Clinical Trial. *Ann. Surg. Oncol.* 23, 4169–4177. 10.1245/s10434-016-5286-0.
203. Harrington, K.J., Hingorani, M., Tanay, M.A., Hickey, J., Bhide, S.A., Clarke, P.M., Renouf, L.C., Thway, K., Sibtain, A., McNeish, I.A., et al. (2010). Phase I/II study of oncolytic HSV GM-CSF in combination with radiotherapy and cisplatin in untreated stage III/IV squamous cell cancer of the head and neck. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 16, 4005–4015. 10.1158/1078-0432.CCR-10-0196.
204. Nguyen, T.-T., Ramsay, L., Ahanfeshar-Adams, M., Lajoie, M., Schadendorf, D., Alain, T., and Watson, I.R. (2021). Mutations in the IFN γ -JAK-STAT Pathway Causing Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors in Melanoma Increase Sensitivity to Oncolytic Virus Treatment. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 27, 3432–3442. 10.1158/1078-0432.CCR-20-3365.
205. Patel, M.R., Dash, A., Jacobson, B.A., Ji, Y., Baumann, D., Ismail, K., and Kratzke, R.A. (2019). JAK/STAT inhibition with ruxolitinib enhances oncolytic virotherapy in non-small cell lung cancer models. *Cancer Gene Ther.* 26, 411–418. 10.1038/s41417-018-0074-6.
206. Nishio, N., Diaconu, I., Liu, H., Cerullo, V., Caruana, I., Hoyos, V., Bouchier-Hayes, L., Savoldo, B., and Dotti, G. (2014). Armed oncolytic virus enhances immune functions of chimeric antigen receptor-modified T cells in solid tumors. *Cancer Res.* 74, 5195–5205. 10.1158/0008-5472.CAN-14-0697.

207. Puzanov, I., Milhem, M.M., Minor, D., Hamid, O., Li, A., Chen, L., Chastain, M., Gorski, K.S., Anderson, A., Chou, J., et al. (2016). Talimogene Laherparepvec in Combination With Ipilimumab in Previously Untreated, Unresectable Stage IIIB-IV Melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *34*, 2619–2626. 10.1200/JCO.2016.67.1529.
208. Chesney, J.A., Ribas, A., Long, G.V., Kirkwood, J.M., Dummer, R., Puzanov, I., Hoeller, C., Gajewski, T.F., Gutzmer, R., Rutkowski, P., et al. (2023). Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Global Phase III Trial of Talimogene Laherparepvec Combined With Pembrolizumab for Advanced Melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *41*, 528–540. 10.1200/JCO.22.00343.
209. Ponce, S., Cedrés, S., Ricordel, C., Isambert, N., Viteri, S., Herrera-Juarez, M., Martinez-Marti, A., Navarro, A., Lederlin, M., Serres, X., et al. (2023). ONCOS-102 plus pemetrexed and platinum chemotherapy in malignant pleural mesothelioma: a randomized phase 2 study investigating clinical outcomes and the tumor microenvironment. *J. Immunother. Cancer* *11*, e007552. 10.1136/jitc-2023-007552.
210. Danson, S.J., Conner, J., Edwards, J.G., Blyth, K.G., Fisher, P.M., Muthana, M., Salawu, A., Taylor, F., Hodgkinson, E., Joyce, P., et al. (2020). Oncolytic herpesvirus therapy for mesothelioma - A phase I/IIa trial of intrapleural administration of HSV1716. *Lung Cancer Amst. Neth.* *150*, 145–151. 10.1016/j.lungcan.2020.10.007.
211. Russell, S.J., Bell, J.C., Engeland, C.E., and McFadden, G. (2022). Advances in oncolytic virotherapy. *Commun. Med.* *2*, 1–3. 10.1038/s43856-022-00098-4.
212. Msaouel, P., Opyrchal, M., Dispenzieri, A., Peng, K.W., Federspiel, M.J., Russell, S.J., and Galanis, E. (2018). Clinical Trials with Oncolytic Measles Virus: Current Status and Future Prospects. *Curr. Cancer Drug Targets* *18*, 177–187. 10.2174/1568009617666170222125035.
213. Mühlebach, M.D. (2020). Measles virus in cancer therapy. *Curr. Opin. Virol.* *41*, 85–97. 10.1016/j.coviro.2020.07.016.
214. Baldo, A., Galanis, E., Tangy, F., and Herman, P. (2016). Biosafety considerations for attenuated measles virus vectors used in virotherapy and vaccination. *Hum. Vaccines Immunother.* *12*, 1102–1116. 10.1080/21645515.2015.1122146.
215. Hübschen, J.M., Gouandjika-Vasilache, I., and Dina, J. (2022). Measles. *The Lancet* *399*, 678–690. 10.1016/S0140-6736(21)02004-3.
216. Meyer, H.M., Hostetler, D.D., Bernheim, B.C., Rogers, N.G., Lambin, P., Chassary, A., and Smadel, J.E. (1964). RESPONSE OF VOLTA CHILDREN TO LIVE ATTENUATED MEASLES VIRUS VACCINE. *Bull. World Health Organ.* *30*, 769–781.
217. Mary, M., Garnerin, P., Roure, C., Villeminot, S., Swartz, T.A., and Valleron, A.J. (1992). Six years of public health surveillance of measles in France. *Int. J. Epidemiol.* *21*, 163–168. 10.1093/ije/21.1.163.
218. Bulletin épidémiologique rougeole. Données de surveillance 2022. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-a-prevention-vaccinale/rougeole/documents/bulletin-national/bulletin-epidemiologique-rougeole.-donnees-de-surveillance-2022>.
219. Mina, M.J., Kula, T., Leng, Y., Li, M., de Vries, R.D., Knip, M., Siljander, H., Rewers, M., Choy, D.F., Wilson, M.S., et al. (2019). Measles virus infection diminishes preexisting antibodies that offer protection from other pathogens. *Science* *366*, 599–606. 10.1126/science.aay6485.

220. Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K., and Yanagi, Y. (2000). SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* *406*, 893–897. 10.1038/35022579.
221. Mühlebach, M.D., Mateo, M., Sinn, P.L., Prüfer, S., Uhlig, K.M., Leonard, V.H.J., Navaratnarajah, C.K., Frenzke, M., Wong, X.X., Sawatsky, B., et al. (2011). Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature* *480*, 530–533. 10.1038/nature10639.
222. Welsch, J.C., Charvet, B., Dussurgey, S., Allatif, O., Aurine, N., Horvat, B., Gerlier, D., and Mathieu, C. (2019). Type I Interferon Receptor Signaling Drives Selective Permissiveness of Astrocytes and Microglia to Measles Virus during Brain Infection. *J. Virol.* *93*, e00618-19. 10.1128/JVI.00618-19.
223. Allen, I.V., McQuaid, S., McMahon, J., Kirk, J., and McConnell, R. (1996). The significance of measles virus antigen and genome distribution in the CNS in SSPE for mechanisms of viral spread and demyelination. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *55*, 471–480. 10.1097/00005072-199604000-00010.
224. Laksono, B.M., Tran, D.N., Kondova, I., van Engelen, H.G.H., Michels, S., Nambulli, S., de Vries, R.D., Duprex, W.P., Verjans, G.M.G.M., and de Swart, R.L. (2021). Comparable Infection Level and Tropism of Measles Virus and Canine Distemper Virus in Organotypic Brain Slice Cultures Obtained from Natural Host Species. *Viruses* *13*, 1582. 10.3390/v13081582.
225. Ferren, M., Lalande, A., Iampietro, M., Canus, L., Decimo, D., Gerlier, D., Porotto, M., and Mathieu, C. (2023). Early Permissiveness of Central Nervous System Cells to Measles Virus Infection Is Determined by Hyperfusogenicity and Interferon Pressure. *Viruses* *15*, 229. 10.3390/v15010229.
226. Ferren, M., Horvat, B., and Mathieu, C. (2019). Measles Encephalitis: Towards New Therapeutics. *Viruses* *11*, 1017. 10.3390/v11111017.
227. Watanabe, S., Shirogane, Y., Sato, Y., Hashiguchi, T., and Yanagi, Y. (2019). New Insights into Measles Virus Brain Infections. *Trends Microbiol.* *27*, 164–175. 10.1016/j.tim.2018.08.010.
228. Shirogane, Y., Harada, H., Hirai, Y., Takemoto, R., Suzuki, T., Hashiguchi, T., and Yanagi, Y. (2023). Collective fusion activity determines neurotropism of an en bloc transmitted enveloped virus. *Sci. Adv.* *9*, eadf3731. 10.1126/sciadv.adf3731.
229. Mathieu, C., Bovier, F.T., Ferren, M., Lieberman, N.A.P., Predella, C., Lalande, A., Peddu, V., Lin, M.J., Addetia, A., Patel, A., et al. (2021). Molecular Features of the Measles Virus Viral Fusion Complex That Favor Infection and Spread in the Brain. *mBio* *12*, e0079921. 10.1128/mBio.00799-21.
230. Sato, Y., Watanabe, S., Fukuda, Y., Hashiguchi, T., Yanagi, Y., and Ohno, S. (2018). Cell-to-Cell Measles Virus Spread between Human Neurons Is Dependent on Hemagglutinin and Hyperfusogenic Fusion Protein. *J. Virol.* *92*, 10.1128/jvi.02166-17. 10.1128/jvi.02166-17.
231. Cattaneo, R., Schmid, A., Eschle, D., Bacsko, K., ter Meulen, V., and Billeter, M.A. (1988). Biased hypermutation and other genetic changes in defective measles viruses in human brain infections. *Cell* *55*, 255–265. 10.1016/0092-8674(88)90048-7.
232. Watanabe, S., Ohno, S., Shirogane, Y., Suzuki, S.O., Koga, R., and Yanagi, Y. (2015). Measles virus mutants possessing the fusion protein with enhanced fusion activity spread effectively in neuronal cells, but not in other cells, without causing strong cytopathology. *J. Virol.* *89*, 2710–2717. 10.1128/JVI.03346-14.

233. Generous, A.R., Harrison, O.J., Troyanovsky, R.B., Mateo, M., Navaratnarajah, C.K., Donohue, R.C., Pfaller, C.K., Alekhina, O., Sergeeva, A.P., Indra, I., et al. (2019). Trans-endocytosis elicited by nectins transfers cytoplasmic cargo, including infectious material, between cells. *J. Cell Sci.* 132, jcs235507. 10.1242/jcs.235507.
234. Makhortova, N.R., Askovich, P., Patterson, C.E., Gechman, L.A., Gerard, N.P., and Rall, G.F. (2007). Neurokinin-1 enables measles virus trans-synaptic spread in neurons. *Virology* 362, 235–244. 10.1016/j.virol.2007.02.033.
235. Shirogane, Y., Takemoto, R., Suzuki, T., Kameda, T., Nakashima, K., Hashiguchi, T., and Yanagi, Y. (2021). CADM1 and CADM2 Trigger Neuropathogenic Measles Virus-Mediated Membrane Fusion by Acting in cis. *J. Virol.* 95, e0052821. 10.1128/JVI.00528-21.
236. Takemoto, R., Suzuki, T., Hashiguchi, T., Yanagi, Y., and Shirogane, Y. (2022). Short-Stalk Isoforms of CADM1 and CADM2 Trigger Neuropathogenic Measles Virus-Mediated Membrane Fusion by Interacting with the Viral Hemagglutinin. *J. Virol.* 96, e0194921. 10.1128/JVI.01949-21.
237. Takemoto, R., Hirai, Y., Watanabe, S., Harada, H., Suzuki, T., Hashiguchi, T., Yanagi, Y., and Shirogane, Y. (2023). Interaction of the Hemagglutinin Stalk Region with Cell Adhesion Molecule (CADM) 1 and CADM2 Mediates the Spread between Neurons and Neuropathogenicity of Measles Virus with a Hyperfusogenic Fusion Protein. *J. Virol.* 97, e0034023. 10.1128/jvi.00340-23.
238. Aref, S., Bailey, K., and Fielding, A. (2016). Measles to the Rescue: A Review of Oncolytic Measles Virus. *Viruses* 8, 294. 10.3390/v8100294.
239. Enders, J.F., and Peebles, T.C. (1954). Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y.* N 86, 277–286. 10.3181/00379727-86-21073.
240. Bankamp, B., Takeda, M., Zhang, Y., Xu, W., and Rota, P.A. (2011). Genetic characterization of measles vaccine strains. *J. Infect. Dis.* 204 Suppl 1, S533-548. 10.1093/infdis/jir097.
241. Suwanmanee, S., Ghimire, S., Edwards, J., and Griffin, D.E. (2023). Infection of Pro- and Anti-Inflammatory Macrophages by Wild Type and Vaccine Strains of Measles Virus: NLRP3 Inflammasome Activation Independent of Virus Production. *Viruses* 15, 260. 10.3390/v15020260.
242. Beaty, S.M., and Lee, B. (2016). Constraints on the Genetic and Antigenic Variability of Measles Virus. *Viruses* 8, 109. 10.3390/v8040109.
243. Hsu, E.C., Sarangi, F., Iorio, C., Sidhu, M.S., Udem, S.A., Dillehay, D.L., Xu, W., Rota, P.A., Bellini, W.J., and Richardson, C.D. (1998). A single amino acid change in the hemagglutinin protein of measles virus determines its ability to bind CD46 and reveals another receptor on marmoset B cells. *J. Virol.* 72, 2905–2916. 10.1128/JVI.72.4.2905-2916.1998.
244. Allagui, F., Achard, C., Panterne, C., Combredet, C., Labarrière, N., Dréno, B., Elgaaied, A.B., Pouliquen, D., Tangy, F., Fonteneau, J.-F., et al. (2017). Modulation of the Type I Interferon Response Defines the Sensitivity of Human Melanoma Cells to Oncolytic Measles Virus. *Curr. Gene Ther.* 16, 419–428. 10.2174/1566523217666170102110502.
245. Aref, S., Castleton, A.Z., Bailey, K., Burt, R., Dey, A., Leongamornlert, D., Mitchell, R.J., Okasha, D., and Fielding, A.K. (2020). Type 1 Interferon Responses Underlie Tumor-Selective

- Replication of Oncolytic Measles Virus. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 28, 1043–1055. 10.1016/j.jymthe.2020.01.027.
246. Berchtold, S., Lampe, J., Weiland, T., Smirnow, I., Schleicher, S., Handgretinger, R., Kopp, H.-G., Reiser, J., Stubenrauch, F., Mayer, N., et al. (2013). Innate immune defense defines susceptibility of sarcoma cells to measles vaccine virus-based oncolysis. *J. Virol.* 87, 3484–3501. 10.1128/JVI.02106-12.
247. Kurokawa, C., Iankov, I.D., Anderson, S.K., Aderca, I., Leontovich, A.A., Maurer, M.J., Oberg, A.L., Schroeder, M.A., Giannini, C., Greiner, S.M., et al. (2018). Constitutive Interferon Pathway Activation in Tumors as an Efficacy Determinant Following Oncolytic Virotherapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 110, 1123–1132. 10.1093/jnci/djy033.
248. Rajaraman, S., Canjuga, D., Ghosh, M., Codrea, M.C., Sieger, R., Wedekink, F., Tatagiba, M., Koch, M., Lauer, U.M., Nahnsen, S., et al. (2018). Measles Virus-Based Treatments Trigger a Pro-inflammatory Cascade and a Distinctive Immunoepitome in Glioblastoma. *Mol. Ther. Oncolytics* 12, 147–161. 10.1016/j.omto.2018.12.010.
249. Braun, E., Hotter, D., Koepke, L., Zech, F., Groß, R., Sparrer, K.M.J., Müller, J.A., Pfaller, C.K., Heusinger, E., Wombacher, R., et al. (2019). Guanylate-Binding Proteins 2 and 5 Exert Broad Antiviral Activity by Inhibiting Furin-Mediated Processing of Viral Envelope Proteins. *Cell Rep.* 27, 2092–2104.e10. 10.1016/j.celrep.2019.04.063.
250. Fehrholz, M., Kendl, S., Prifert, C., Weissbrich, B., Lemon, K., Rennick, L., Duprex, P.W., Rima, B.K., Koning, F.A., Holmes, R.K., et al. (2012). The innate antiviral factor APOBEC3G targets replication of measles, mumps and respiratory syncytial viruses. *J. Gen. Virol.* 93, 565–576. 10.1099/vir.0.038919-0.
251. Tiwarekar, V., Wohlfahrt, J., Fehrholz, M., Scholz, C.-J., Kneitz, S., and Schneider-Schaulies, J. (2018). APOBEC3G-Regulated Host Factors Interfere with Measles Virus Replication: Role of REDD1 and Mammalian TORC1 Inhibition. *J. Virol.* 92, e00835-18. 10.1128/JVI.00835-18.
252. Tiwarekar, V., Fehrholz, M., and Schneider-Schaulies, J. (2019). KDELR2 Competes with Measles Virus Envelope Proteins for Cellular Chaperones Reducing Their Chaperone-Mediated Cell Surface Transport. *Viruses* 11, 27. 10.3390/v11010027.
253. Kurokawa, C., Iankov, I.D., and Galanis, E. (2019). A key anti-viral protein, RSAD2/VIPERIN, restricts the release of measles virus from infected cells. *Virus Res.* 263, 145–150. 10.1016/j.virusres.2019.01.014.
254. Kelly, J.T., Human, S., Alderman, J., Jobe, F., Logan, L., Rix, T., Gonçalves-Carneiro, D., Leung, C., Thakur, N., Birch, J., et al. (2019). BST2/Tetherin Overexpression Modulates Morbillivirus Glycoprotein Production to Inhibit Cell-Cell Fusion. *Viruses* 11, 692. 10.3390/v11080692.
255. Schoggins, J.W., MacDuff, D.A., Imanaka, N., Gainey, M.D., Shrestha, B., Eitson, J.L., Mar, K.B., Richardson, R.B., Ratushny, A.V., Litvak, V., et al. (2014). Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity. *Nature* 505, 691–695. 10.1038/nature12862.
256. Jiang, Y., Qin, Y., and Chen, M. (2016). Host-Pathogen Interactions in Measles Virus Replication and Anti-Viral Immunity. *Viruses* 8, 308. 10.3390/v8110308.
257. Amurri, L., Reynard, O., Gerlier, D., Horvat, B., and Iampietro, M. (2022). Measles Virus-Induced Host Immunity and Mechanisms of Viral Evasion. *Viruses* 14, 2641. 10.3390/v14122641.

258. Ohno, S., Ono, N., Takeda, M., Takeuchi, K., and Yanagi, Y. (2004). Dissection of measles virus V protein in relation to its ability to block alpha/beta interferon signal transduction. *J. Gen. Virol.* *85*, 2991–2999. 10.1099/vir.0.80308-0.
259. Sparrer, K.M.J., Pfaller, C.K., and Conzelmann, K.-K. (2012). Measles virus C protein interferes with Beta interferon transcription in the nucleus. *J. Virol.* *86*, 796–805. 10.1128/JVI.05899-11.
260. Pidelaserra-Martí, G., and Engeland, C.E. (2020). Mechanisms of measles virus oncolytic immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* *56*, 28–38. 10.1016/j.cytogfr.2020.07.009.
261. Chen, A., Zhang, Y., Meng, G., Jiang, D., Zhang, H., Zheng, M., Xia, M., Jiang, A., Wu, J., Beltinger, C., et al. (2017). Oncolytic measles virus enhances antitumour responses of adoptive CD8+NKG2D+ cells in hepatocellular carcinoma treatment. *Sci. Rep.* *7*, 5170. 10.1038/s41598-017-05500-z.
262. 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). Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Armed Oncolytic Measles Virus Is an Effective Therapeutic Cancer Vaccine. *Hum. Gene Ther.* *24*, 644–654. 10.1089/hum.2012.205.
263. Zhao, D., Chen, P., Yang, H., Wu, Y., Zeng, X., Zhao, Y., Wen, Y., Zhao, X., Liu, X., Wei, Y., et al. (2013). Live attenuated measles virus vaccine induces apoptosis and promotes tumor regression in lung cancer. *Oncol. Rep.* *29*, 199–204. 10.3892/or.2012.2109.
264. Engeland, C.E., Grossardt, C., Veinalde, R., Bossow, S., Lutz, D., Kaufmann, J.K., Shevchenko, I., Umansky, V., Nettelbeck, D.M., Weichert, W., et al. (2014). CTLA-4 and PD-L1 Checkpoint Blockade Enhances Oncolytic Measles Virus Therapy. *Mol. Ther.* *22*, 1949–1959. 10.1038/mt.2014.160.
265. Backhaus, P.S., Veinalde, R., Hartmann, L., Dunder, J.E., Jeworowski, L.M., Albert, J., Hoyler, B., Poth, T., Jäger, D., Ungerechts, G., et al. (2019). Immunological Effects and Viral Gene Expression Determine the Efficacy of Oncolytic Measles Vaccines Encoding IL-12 or IL-15 Agonists. *Viruses* *11*, 914. 10.3390/v11100914.
266. Veinalde, R., Grossardt, C., Hartmann, L., Bourgeois-Daigneault, M.-C., Bell, J.C., Jäger, D., von Kalle, C., Ungerechts, G., and Engeland, C.E. (2017). Oncolytic measles virus encoding interleukin-12 mediates potent antitumor effects through T cell activation. *Oncoimmunology* *6*, e1285992. 10.1080/2162402X.2017.1285992.
267. Grote, D., Cattaneo, R., and Fielding, A.K. (2003). Neutrophils Contribute to the Measles Virus-induced Antitumor Effect: Enhancement by Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor Expression. *Cancer Res.* *63*, 6463–6468.
268. Zhang, Y., Patel, B., Dey, A., Ghorani, E., Rai, L., Elham, M., Castleton, A.Z., and Fielding, A.K. (2012). Attenuated, Oncolytic, but Not Wild-Type Measles Virus Infection Has Pleiotropic Effects on Human Neutrophil Function. *J. Immunol.* *188*, 1002–1010. 10.4049/jimmunol.1102262.
269. Klose, C., Berchtold, S., Schmidt, M., Beil, J., Smirnow, I., Venturelli, S., Burkard, M., Handgretinger, R., and Lauer, U.M. (2019). Biological treatment of pediatric sarcomas by combined virotherapy and NK cell therapy. *BMC Cancer* *19*, 1172. 10.1186/s12885-019-6387-5.

270. Iankov, I.D., Kurokawa, C., Viker, K., Robinson, S.I., Ammayappan, A., Panagioti, E., Federspiel, M.J., and Galanis, E. (2020). Live Attenuated Measles Virus Vaccine Expressing Helicobacter pylori Heat Shock Protein A. *Mol. Ther. Oncolytics* 19, 136–148. 10.1016/j.omto.2020.09.006.
271. Hardcastle, J., Mills, L., Malo, C.S., Jin, F., Kurokawa, C., Geekiyanage, H., Schroeder, M., Sarkaria, J., Johnson, A.J., and Galanis, E. (2017). Immunovirotherapy with measles virus strains in combination with anti-PD-1 antibody blockade enhances antitumor activity in glioblastoma treatment. *Neuro-Oncol.* 19, 493–502. 10.1093/neuonc/now179.
272. Panagioti, E., Kurokawa, C., Viker, K., Ammayappan, A., Anderson, S.K., Sotiriou, S., Chatzopoulos, K., Ayasoufi, K., Johnson, A.J., Iankov, I.D., et al. (2021). Immunostimulatory bacterial antigen-armed oncolytic measles virotherapy significantly increases the potency of anti-PD1 checkpoint therapy. *J. Clin. Invest.* 131, e141614. 10.1172/JCI141614.
273. Dingli, D., Peng, K.-W., Harvey, M.E., Greipp, P.R., O'Connor, M.K., Cattaneo, R., Morris, J.C., and Russell, S.J. (2004). Image-guided radiovirotherapy for multiple myeloma using a recombinant measles virus expressing the thyroidal sodium iodide symporter. *Blood* 103, 1641–1646. 10.1182/blood-2003-07-2233.
274. 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.
275. Russell, S.J., Federspiel, M.J., Peng, K.-W., Tong, C., Dingli, D., Morice, W.G., Lowe, V., O'Connor, M.K., Kyle, R.A., Leung, N., et al. (2014). Remission of Disseminated Cancer After Systemic Oncolytic Virotherapy. *Mayo Clin. Proc.* 89, 926–933. 10.1016/j.mayocp.2014.04.003.
276. Dispenzieri, A., Tong, C., LaPlant, B., Lacy, M.Q., Laumann, K., Dingli, D., Zhou, Y., Federspiel, M.J., Gertz, M.A., Hayman, S., et al. (2017). Phase I Trial of Systemic Administration of Edmonston Strain of Measles Virus, Genetically Engineered to Express the Sodium Iodide Symporter in Patients with Recurrent or Refractory Multiple Myeloma. *Leukemia* 31, 2791–2798. 10.1038/leu.2017.120.
277. Packiriswamy, N., Upreti, D., Zhou, Y., Khan, R., Miller, A., Diaz, R.M., Rooney, C.M., Dispenzieri, A., Peng, K.-W., and Russell, S.J. (2020). Oncolytic measles virus therapy enhances tumor antigen-specific T-cell responses in patients with multiple myeloma. *Leukemia* 34, 3310–3322. 10.1038/s41375-020-0828-7.
278. Galanis, E., Atherton, P.J., Maurer, M.J., Knutson, K.L., Dowdy, S.C., Cliby, W.A., Haluska, P., Long, H.J., Oberg, A., Aderca, I., et al. (2015). Oncolytic Measles Virus Expressing the Sodium Iodide Symporter to Treat Drug-Resistant Ovarian Cancer. *Cancer Res.* 75, 22–30. 10.1158/0008-5472.CAN-14-2533.
279. Heinzerling, L., Künzi, V., Oberholzer, P.A., Kündig, T., Naim, H., and Dummer, R. (2005). Oncolytic measles virus in cutaneous T-cell lymphomas mounts antitumor immune responses in vivo and targets interferon-resistant tumor cells. *Blood* 106, 2287–2294. 10.1182/blood-2004-11-4558.
280. Mayo Clinic (2023). Phase I Trial of Intratumoral Administration of a Measles Virus Derivative Expressing the Helicobacter Pylori Neutrophil-Activating Protein (NAP) (MV-s-NAP) in Patients With Metastatic Breast Cancer (clinicaltrials.gov).

281. Amedei, A., Cappon, A., Codolo, G., Cabrelle, A., Polenghi, A., Benagiano, M., Tasca, E., Azzurri, A., D'Elia, M.M., Del Prete, G., et al. (2006). The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* promotes Th1 immune responses. *J. Clin. Invest.* *116*, 1092–1101. 10.1172/JCI27177.
282. Iankov, I.D., Allen, C., Federspiel, M.J., Myers, R.M., Peng, K.W., Ingle, J.N., Russell, S.J., and Galanis, E. (2012). Expression of immunomodulatory neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* enhances the antitumor activity of oncolytic measles virus. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *20*, 1139–1147. 10.1038/mt.2012.4.
283. Viker, K.B., Steele, M.B., Iankov, I.D., Concilio, S.C., Ammayappan, A., Bolon, B., Jenks, N.J., Goetz, M.P., Panagioti, E., Federspiel, M.J., et al. (2022). Preclinical safety assessment of MV-s-NAP, a novel oncolytic measles virus strain armed with an H . pylori immunostimulatory bacterial transgene. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* *26*, 532–546. 10.1016/j.omtm.2022.07.014.
284. 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. 10.1158/0008-5472.CAN-09-2762.
285. Tangy, F., Gregoire, M., FONTENEAU, J.-F., GUILLERME, J.-B., and Combredet, C. (2015). Use of a genetically modified infectious measles virus with enhanced pro-apoptotic properties (mv-deltac virus) in cancer therapy.
286. US Patent for Use of a genetically modified infectious measles virus with enhanced pro-apoptotic properties (MV-deltaC virus) in cancer therapy Patent (Patent # 10,980,873 issued April 20, 2021) - Justia Patents Search <https://patents.justia.com/patent/10980873>.
287. Grard, M. (2023). Caractérisation des facteurs de résistance des cancers thoraciques au virus oncolytique de la rougeole en modèle 3D (Thèse doctorale). <https://theses.hal.science/tel-04151056>.
288. Blanquart, C., Jaurand, M.-C., and Jean, D. (2020). The Biology of Malignant Mesothelioma and the Relevance of Preclinical Models. *Front. Oncol.* *10*, 388. 10.3389/fonc.2020.00388.
289. Shamseddin, M., Obacz, J., Garnett, M.J., Rintoul, R.C., Francies, H.E., and Marciniak, S.J. (2021). Use of preclinical models for malignant pleural mesothelioma. *Thorax* *76*, 1154–1162. 10.1136/thoraxjnl-2020-216602.
290. Bhattacharya, P., Budnick, I., Singh, M., Thiruppathi, M., Alharshawy, K., Elshabrawy, H., Holterman, M.J., and Prabhakar, B.S. (2015). Dual Role of GM-CSF as a Pro-Inflammatory and a Regulatory Cytokine: Implications for Immune Therapy. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* *35*, 585–599. 10.1089/jir.2014.0149.
291. Achkova, D., and Maher, J. (2016). Role of the colony-stimulating factor (CSF)/CSF-1 receptor axis in cancer. *Biochem. Soc. Trans.* *44*, 333–341. 10.1042/BST20150245.
292. Minnema-Luiting, J., Vroman, H., Aerts, J., and Cornelissen, R. (2018). Heterogeneity in Immune Cell Content in Malignant Pleural Mesothelioma. *Int. J. Mol. Sci.* *19*, 1041. 10.3390/ijms19041041.
293. Cornelissen, R., Lievense, L.A., Maat, A.P., Hendriks, R.W., Hoogsteden, H.C., Bogers, A.J., Hegmans, J.P., and Aerts, J.G. (2014). Ratio of intratumoral macrophage phenotypes is a

- prognostic factor in epithelioid malignant pleural mesothelioma. *PloS One* 9, e106742. 10.1371/journal.pone.0106742.
294. Plumet, S., Herschke, F., Bourhis, J.-M., Valentin, H., Longhi, S., and Gerlier, D. (2007). Cytosolic 5'-triphosphate ended viral leader transcript of measles virus as activator of the RIG I-mediated interferon response. *PloS One* 2, e279. 10.1371/journal.pone.0000279.
295. Ohgimoto, K., Ohgimoto, S., Ihara, T., Mizuta, H., Ishido, S., Ayata, M., Ogura, H., and Hotta, H. (2007). Difference in production of infectious wild-type measles and vaccine viruses in monocyte-derived dendritic cells. *Virus Res.* 123, 1–8. 10.1016/j.virusres.2006.07.006.
296. Koethe, S., Avota, E., and Schneider-Schaulies, S. (2012). Measles virus transmission from dendritic cells to T cells: formation of synapse-like interfaces concentrating viral and cellular components. *J. Virol.* 86, 9773–9781. 10.1128/JVI.00458-12.
297. Veinalde, R., Pidelaserra-Martí, G., Moulin, C., Jeworowski, L.M., Küther, L., Buchholz, C.J., Jäger, D., Ungerechts, G., and Engeland, C.E. (2022). Oncolytic measles vaccines encoding PD-1 and PD-L1 checkpoint blocking antibodies to increase tumor-specific T cell memory. *Mol. Ther. Oncolytics* 24, 43–58. 10.1016/j.omto.2021.11.020.
298. Thomas OGOR (2022). Ciblage cellulaire spécifique de l'interféron alpha pour le controle des défenses immunitaires antitumorales. (thèse doctorale). https://ged.biu-montpellier.fr/florabium/jsp/win_main_biu.jsp?nnt=2022UMONT001&success=%2Fjsp%2Fwin_main_biu.jsp&profile=anonymous.
299. Zamarin, D., Holmgaard, R.B., Subudhi, S.K., Park, J.S., Mansour, M., Palese, P., Merghoub, T., Wolchok, J.D., and Allison, J.P. (2014). Localized oncolytic virotherapy overcomes systemic tumor resistance to immune checkpoint blockade immunotherapy. *Sci. Transl. Med.* 6, 226ra32. 10.1126/scitranslmed.3008095.
300. Ricca, J.M., Oseledchyk, A., Walther, T., Liu, C., Mangarin, L., Merghoub, T., Wolchok, J.D., and Zamarin, D. (2018). Pre-existing Immunity to Oncolytic Virus Potentiates Its Immunotherapeutic Efficacy. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 26, 1008–1019. 10.1016/j.ymthe.2018.01.019.
301. 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. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 4374–4381. 10.1158/1078-0432.CCR-09-0334.
302. Wang, W., Liu, S., Dai, P., Yang, N., Wang, Y., Giese, R.A., Merghoub, T., Wolchok, J., and Deng, L. (2021). Elucidating mechanisms of antitumor immunity mediated by live oncolytic vaccinia and heat-inactivated vaccinia. *J. Immunother. Cancer* 9, e002569. 10.1136/jitc-2021-002569.
303. Davola, M.E., and Mossman, K.L. (2019). Oncolytic viruses: how “lytic” must they be for therapeutic efficacy? *Oncoimmunology* 8, e1581528. 10.1080/2162402X.2019.1596006.
304. Vile, R.G. (2018). The Immune System in Oncolytic Immunovirotherapy: Gospel, Schism and Heresy. *Mol. Ther.* 26, 942–946. 10.1016/j.ymthe.2018.03.007.
305. Wongthida, P., Diaz, R.M., Galivo, F., Kottke, T., Thompson, J., Melcher, A., and Vile, R. (2011). VSV Oncolytic Virotherapy in the B16 Model Depends Upon Intact MyD88 Signaling. *Mol. Ther.* 19, 150–158. 10.1038/mt.2010.225.

306. Crouse, J., Kalinke, U., and Oxenius, A. (2015). Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 231–242. 10.1038/nri3806.
307. Schiavoni, G., Mattei, F., and Gabriele, L. (2013). Type I Interferons as Stimulators of DC-Mediated Cross-Priming: Impact on Anti-Tumor Response. *Front. Immunol.* *4*, 483. 10.3389/fimmu.2013.00483.
308. van den Bossche, W.B.L., Kleijn, A., Teunissen, C.E., Voerman, J.S.A., Teodosio, C., Noske, D.P., van Dongen, J.J.M., Dirven, C.M.F., and Lamfers, M.L.M. (2018). Oncolytic virotherapy in glioblastoma patients induces a tumor macrophage phenotypic shift leading to an altered glioblastoma microenvironment. *Neuro-Oncol.* *20*, 1494–1504. 10.1093/neuonc/now082.
309. Cook, J., Peng, K.-W., Witzig, T.E., Broski, S.M., Villasboas, J.C., Paludo, J., Patnaik, M., Rajkumar, V., Dispenzieri, A., Leung, N., et al. (2022). Clinical activity of single-dose systemic oncolytic VSV virotherapy in patients with relapsed refractory T-cell lymphoma. *Blood Adv.* *6*, 3268–3279. 10.1182/bloodadvances.2021006631.
310. Moehler, M., Heo, J., Lee, H.C., Tak, W.Y., Chao, Y., Paik, S.W., Yim, H.J., Byun, K.S., Baron, A., Ungerechts, G., et al. (2019). Vaccinia-based oncolytic immunotherapy Pexastimogene Devacirepvec in patients with advanced hepatocellular carcinoma after sorafenib failure: a randomized multicenter Phase IIb trial (TRAVERSE). *Oncoimmunology* *8*, 1615817. 10.1080/2162402X.2019.1615817.
311. Vannini, A., Leoni, V., and Campadelli-Fiume, G. (2021). Targeted Delivery of IL-12 Adjuvants Immunotherapy by Oncolytic Viruses. *Adv. Exp. Med. Biol.* *1290*, 67–80. 10.1007/978-3-030-55617-4_4.
312. Locatelli-Sanchez, D.M., Avrillon, V., Lantuejoul, S., Scherpereel, A., and Zalcman, G. (2022). Mésothéliome pleural 2022. *Réf. Auvergne Rhône-Alpes En Oncol. Thorac.*
313. Shek, D., Gloss, B., Lai, J., Ma, L., Zhang, H.E., Carlino, M.S., Mahajan, H., Nagrial, A., Gao, B., Read, S.A., et al. (2023). Identification and Characterisation of Infiltrating Immune Cells in Malignant Pleural Mesothelioma Using Spatial Transcriptomics. *Methods Protoc.* *6*, 35. 10.3390/mps6020035.
314. Formenti, S.C., Rudqvist, N.-P., Golden, E., Cooper, B., Wennerberg, E., Lhuillier, C., Vanpouille-Box, C., Friedman, K., Ferrari de Andrade, L., Wucherpfennig, K.W., et al. (2018). Radiotherapy induces responses of lung cancer to CTLA-4 blockade. *Nat. Med.* *24*, 1845–1851. 10.1038/s41591-018-0232-2.
315. Ye, Z., Dong, H., Li, Y., Ma, T., Huang, H., Leong, H.S., Eckel-Passow, J., Kocher, J.-P.A., Liang, H., and Wang, L. (2018). Prevalent Homozygous Deletions of Type I Interferon and Defense Genes in Human Cancers Associate with Immunotherapy Resistance. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *24*, 3299–3308. 10.1158/1078-0432.CCR-17-3008.
316. Zhou, L., Zhang, Y., Wang, Y., Zhang, M., Sun, W., Dai, T., Wang, A., Wu, X., Zhang, S., Wang, S., et al. (2020). A Dual Role of Type I Interferons in Antitumor Immunity. *Adv. Biosyst.* *4*, e1900237. 10.1002/adbi.201900237.
317. Ilkow, C.S., Marguerie, M., Batenchuk, C., Mayer, J., Ben Neriah, D., Cousineau, S., Falls, T., Jennings, V.A., Boileau, M., Bellamy, D., et al. (2015). Reciprocal cellular cross-talk within the tumor microenvironment promotes oncolytic virus activity. *Nat. Med.* *21*, 530–536. 10.1038/nm.3848.

ANNEXES

LISTE DES COMMUNICATIONS REALISEES AU COURS DE LA THESE

Posters

14th International Oncolytic Virotherapy Conference, Karuizawa, Japon, octobre 2022

Journées du Cancéropôle Grand-Ouest, Angers, France, juin 2022

Journées scientifiques de l'école doctorale Biologie-Santé, Nantes, France, avril 2023

16th International Mesothelioma Interest Group, Lille, France, juin 2023

30th annual congress of European Society of Gene & Cell Therapy, Bruxelles Belgique, octobre 2023

Communication orale

Symposium GPI3/CRHMR, Nantes, France, juin 2023

Séminaire interne du CRCI2NA, Nantes, France, juin 2023

LISTE DES PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Frequent Homozygous Deletions of Type I Interferon Genes in Pleural Mesothelioma Confer Sensitivity to Oncolytic Measles Virus

Journal of Thoracic Oncology, 2019

Tiphaine Delaunay, Carole Achard, Nicolas Boisgerault, Marion Grard, Tacien Petithomme, **Camille Chatelain**, Soizic Dutoit, Christophe Blanquart, Pierre-Joseph Royer, Stéphane Minvielle, Lisa Quetel, Clément Meiller, Didier Jean, Delphine Fradin, Jaafar Bennouna, Antoine Magnan, Laurent Cellerin, Frédéric Tangy, Marc Grégoire, Jean-François Fonteneau

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

Frontiers in Oncology, 2021

Marion Grard*, **Camille Chatelain***, Tiphaine Delaunay, Elvire Pons-Tostivint, Jaafar Bennouna and Jean-François Fonteneau

* Co-premières auteures

Apoptosis during ZIKA Virus Infection: Too Soon or Too Late?

International Journal of Molecular Sciences, 2022

Jonathan Turpin, Daed El Safadi, Grégoire Lebeau, Morgane Krejbich, **Camille Chatelain**, Philippe Desprès, Wildriss Viranaïcken and Pascale Krejbich-Trotot



Frequent Homozygous Deletions of Type I Interferon Genes in Pleural Mesothelioma Confer Sensitivity to Oncolytic Measles Virus

Tiphaine Delaunay, PhD,^{a,b} Carole Achard, PhD,^{a,b} Nicolas Boisgerault, PhD,^{a,b} Marion Grard, MS,^{a,b} Tacien Petithomme, MS,^{a,b} Camille Chatelain, MS,^{a,b} Soizic Dutoit, MS,^{a,b} Christophe Blanquart, PhD,^{a,b} Pierre-Joseph Royer, PhD,^c Stéphane Minvielle, PhD,^a Lisa Quetel, PhD,^d Clément Meiller, MS,^d Didier Jean, PhD,^d Delphine Fradin, PhD,^{a,b} Jaafar Bennouna, MD,^{a,b,e} Antoine Magnan, MD,^{c,f} Laurent Cellerin, MD,^f Frédéric Tangy, PhD,^g Marc Grégoire, PhD,^{a,b} Jean-François Fonteneau, PhD^{a,b,*}

^aCRCINA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France

^bLabex IGO, Immunology Graft Oncology, Nantes, France

^cINSERM, UMRS1087, Institut du Thorax, Université de Nantes, Nantes, France

^dCentre de Recherche des Cordeliers, Inserm, Sorbonne Université, Université de Paris, Functional Genomics of Solid Tumors, Paris, France

^eCHU de Nantes, oncologie thoracique et digestive, Université de Nantes, Nantes, France

^fCHU de Nantes, Service de Pneumologie, Université de Nantes, Nantes, France

^gCNRS 3569, Institut Pasteur, Paris, France

Received 5 February 2019; revised 11 December 2019; accepted 22 December 2019

Available online - 13 January 2020

ABSTRACT

Introduction: Oncolytic immunotherapy is based on the use of nonpathogenic replicative oncolytic viruses that infect and kill tumor cells exclusively. Recently, we found that the spontaneous oncolytic activity of the Schwarz strain of measles virus (MV) against human malignant pleural mesothelioma (MPM) depends on defects in the antiviral type I interferon (IFN-I) response in tumor cells.

Methods: In this study, we studied three independent human MPM bio-collections to identify the defects in the IFN-I responses in tumor cells.

Results: We show that the most frequent defect is the homozygous deletions (HDs) of all the 14 IFN-I genes (IFN- α and IFN- β) that we found in more than half of MV-sensitive MPM cell lines. These HDs occur together with the HDs of the tumor suppressor gene *CDKN2A* also located in the 9p21.3 chromosome region. Therefore, the IFN-I^{-/-} MPM cell lines develop a partial and weak IFN-I response when they are exposed to the virus compared with that of normal cells and MV-resistant MPM cell lines. This response consists of the expression of a restricted number of IFN-stimulated genes that do not depend on the presence of IFN-I. In addition, the IFN-I^{-/-} MPM cell lines infected by MV also develop a pro-inflammatory response associated with stress of the endoplasmic reticulum.

Conclusion: Our study emphasizes the link between HDs of IFN-I encoding genes and the *CDKN2A* gene in MPM and sensitivity to MV oncolytic immunotherapy.

© 2020 International Association for the Study of Lung Cancer. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Oncolytic immunotherapy; Measles virus; Type I interferon; Gene homozygous deletion; Mesothelioma

Introduction

Oncolytic immunotherapy is a developing strategy to treat cancer that is based on the use of nonpathogenic replicative oncolytic viruses (OVs). OVs exclusively repli-

*Corresponding author.

Disclosure: Dr Tangy, Dr Grégoire, and Dr Fonteneau are authors of patents on measles virus. The remaining authors declare no conflict of interest.

Address for correspondence: Jean-François Fonteneau, PhD, INSERM U1232, CRCINA, Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes, 8 quai Moncousu, BP70721, 44007 Nantes cedex 1, France. E-mail: jean-francois.fonteneau@inserm.fr

© 2020 International Association for the Study of Lung Cancer. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

ISSN: 1556-0864

<https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.12.128>

cate in and kill tumor cells and stimulate the antitumor immune response.¹ Indeed, viral replication is often favored in tumors owing to the presence of an immunosuppressive environment and defects in several pathways in tumor cells such as apoptotic or antiviral pathways that are normally used to prevent viral replication.²

Attenuated vaccine strains of measles virus (MV) such as Edmonston or Schwarz strains display a spontaneous oncolytic activity against numerous tumor cell types.^{3,4} These strains use the CD46 molecule as a second receptor to infect human cells, unlike the pathogenic strains that mainly use the CD150 molecule.^{5,6} Tumor cells often overexpress CD46 to escape complement-mediated cytotoxicity.^{7,8} This expression at high density favors the infection of tumor cells by attenuated MV.⁹ We and others have reported that the oncolytic activity of MV also depends on deficiencies of the antiviral type-I interferon (IFN-I) response in tumor cells.¹⁰⁻¹² All nucleated cells are able to detect viral infection using intracytoplasmic pattern recognition receptors (PRRs).¹³ In the case of MV, cytosolic helicases such as RIG-I and MDA5 detect the viral RNA and send a signal to the nucleus through IRF3, nuclear factor κ B (NF- κ B). This signal induces the secretion of IFN-I that protects infected and neighboring cells from further viral replication. Indeed, exposure to IFN-I induces the expression of hundreds of IFN-stimulated genes (ISGs) in cells that express the IFN- α or - β receptors (IFNARs). These ISGs are directly or indirectly responsible for the antiviral activity. Some of these ISGs such as ISG15 or ISG54 (IFIT1) can be directly activated in response to the virus through IRF3 without the need of IFN-I, whereas others require IFN-I and IFNAR signaling.¹³⁻¹⁵

Malignant pleural mesothelioma (MPM) is a cancer of the pleura often resulting from long-term asbestos exposure.¹⁶ Treatments of MPM include chemotherapy, radiotherapy, and surgery and are of limited efficacy, urging the development of new therapeutic approaches such as oncolytic immunotherapy. In a recent study, we reported that 15 of 22 human MPM cell lines were sensitive to Schwarz MV oncolytic activity owing to defects of their antiviral IFN-I response.¹⁰ Eleven of these 15 MPM cell lines were unable to secrete IFN-I (IFN- α and IFN- β) in response to MV, making them permissive to the viral replication that ended up killing them. However, these cell lines were able to control viral replication and to resist MV oncolytic activity if they were previously exposed to IFN-I, suggesting that the defects of the IFN-I response were located upstream of IFNAR. The other seven MPM cell lines and four types of healthy cells were able to produce type I IFN when exposed to MV and thus block viral replication and cell lysis.

In this study, we aimed at further identifying the defects of IFN-I response present in MPM tumor cells

that make them sensitive to MV oncolytic activity. We also wanted to characterize their effects on the cellular response to the virus. We show that the most frequent defect in MPM is the homozygous deletions (HDs) of all genes encoding IFN-I (IFN- α and IFN- β) that were found in eight of the 15 MV-sensitive MPM cell lines. These frequent HDs of IFN-I-encoding genes in MPM that occur together with the HD of *CDKN2A* gene represent a therapeutic target that can be exploited with OVIs such as Schwarz MV to induce immunogenic death of tumor cells.

Materials and Methods

Cell Culture

Human MPM cell lines (from Meso 4 to Meso 225) were established in our laboratory from pleural effusions that were collected by thoracentesis and genetically characterized.¹⁷ All patients gave their informed consent. All cell lines were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, and 2 mM L-glutamine (all reagents from Gibco-Invitrogen) and cultured at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Normal peritoneal mesothelial cells, MES-F, were purchased from tebu-bio; pulmonary fibroblasts CCD-19Lu were purchased from the ATCC-LGC Standards, and pulmonary endothelial cells HMVEC-L from Lonza. These cells were cultured in their specific media according to the manufacturer's recommendations. The bronchial epithelial cells were obtained and cultured as previously described.¹⁸ Cells were routinely checked for mycoplasma contamination using the PlasmoTest from InvivoGen.

The 78 MPM cell lines used to confirm the HD of *IFNB1* gene were early passages of primary tumor cells established at INSERM U1162 laboratory, Paris, from surgical resection, pleural biopsies, or malignant pleural fluid of confirmed MPM cases obtained from several French hospitals with patients' consents.^{19,20}

MV Infection, IFN, and Inhibitor Treatments

Live-attenuated Schwarz vaccine strain of MV, MV recombinant for the enhanced green fluorescent protein, and MV recombinant for the cherry protein (MV-ch) were produced and purified as previously described.²¹ Infection of cells with MV lasted 2 hours at 37°C. Viral inoculum was then replaced by fresh culture medium, unless otherwise indicated. Type I IFN treatment was performed by adding rhIFN- α 2a and rhIFN- β 1a (ImmunoTools) at 1000 IU/mL within 48 hours. The IFN-I pathway was inhibited by ruxolitinib, a chemical inhibitor of janus-associated kinases (JAK1, JAK2, and JAK3), at 1 μ M 3 days before infection and added every day during the time of the experiment.

MV Replication Assay

Three days before infection, cells were seeded in six-well plates at a density of 0.5×10^6 cells per well for the MPM cell lines with or without ruxolitinib. A day before infection, cells were seeded in 96-well plates, at a density of 10,000 cells per well. Infection was performed at a multiplicity of infection of one (MOI = 1), and fluorescence at 610 nm was analyzed every day for 9 days using a ChemiDoc MP imaging system (Bio-Rad). Quantification was performed with the Image Lab 4.1 Software (Bio-Rad) with the relative fluorescence corresponding to the ratio between the fluorescence measured in treated and nontreated cells.

Confocal Microscopy

MPM cell lines were seeded in an eight-well silicone cultivation chamber (IBIDI) at a density of 0.5×10^5 cells per well and then infected with MV at an MOI of 10 for 12 hours. Cell membrane cells were labeled with wheat germ agglutinin, a lectin marker, at 5 $\mu\text{g/mL}$ for 10 minutes at room temperature. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 minutes at room temperature; cell and nuclear membranes were permeabilized for 5 minutes at 20°C with absolute methanol and then blocked in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% bovine serum albumin (BSA; Sigma Aldrich) at 4°C overnight. Cells were incubated for 5 minutes in PBS 0.1% BSA 0.1% saponin (Sigma Aldrich) and then with anti-IRF3 and NF- κB primary antibodies (Cell Signaling Technology) for 1 hour, followed by incubation with DyLight 488-coupled secondary antibodies (Life Technologies) for 20 minutes at room temperature. For these incubations monoclonal antibodies were diluted in PBS 0.1% BSA 0.1% saponin. Finally, nuclei were labeled with Hoescht for 5 minutes at room temperature. Labeled cells were directly viewed with a confocal microscope (Nikon A1RSi). The images were recorded with NIS Element software (version 3.6, Nikon) and processed with the software Fiji.²² Ratio of the nuclei to cytoplasm fluorescence intensity was measured with the Volocity software (Perkin-Elmer).

Real-Time Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction

MPM cell lines and healthy cells were seeded in six-, 12-, or 24-well plates at a density of 0.5×10^6 , 0.25×10^6 , or 0.1×10^6 cells per well, respectively. Thereafter, cells were treated with type I IFNs or ruxolitinib or infected with MV at an MOI of 1 for 48 hours or an MOI of 10 for 12 hours. Total cell RNA was extracted using the Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel), and 0.5 μg or 0.25 μg total RNA was reverse-transcribed using MMLV reverse transcriptase (Invitrogen). Polymerase chain reaction (PCR) reactions were conducted using

QuantiTect primer assays (Qiagen) and Maxima SYBR Green to ROX qPCR Master Mix (Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Gene expression was analyzed in treated or untreated cells using QuantiTect primers pairs for *Mx1*, *TLR3*, *IRF7*, *STAT1*, *XAF1*, *IFIT1*, *DDX58 (RIG-I)*, *OAS1*, *IRF3*, *RELA (p65)*, and *RSAD2*. Gene expression was expressed as relative expression compared with the expression of a housekeeping gene that encodes the human large ribosomal protein (*RPLPO*) and in fold change ($\Delta\Delta\text{Ct} = [\text{Ct gene nontreated} - \text{Ct } RPLPO \text{ nontreated}] - [\text{Ct gene treated} - \text{Ct } RPLPO \text{ treated}]$).

Genomic PCR

Genomic DNA was extracted with the Nucleospin Blood kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. In addition, 250 ng of genomic DNA was amplified according Phusion hot start II high fidelity DNA polymerase protocol (thermo scientific). The following primers were used: 5'-GGTCGTTTGCTTTCCTTTGCG-3' (forward) and 5'-AGCAATTGTCCAGTCCCAGA-3' (reverse) for *IFNB1* gene. A two-step cycling protocol was used with one cycle during 30 seconds at 98°C, then 30 cycles of amplification 10 seconds at 98°C and 1 minute at 72°C after a final extension of 7 minutes at 72°C. The Genomic PCR on the 80 MPM cell lines of the validation series was performed as described in [Supplementary Material and Methods](#).

Genomic Array Analysis

Genomic DNA was extracted with Nucleospin Blood kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. DNA (500 ng) was processed and hybridized to Affymetrix CytoScanHD Array according to the manufacturer's instructions (Affymetrix, Santa Clara, CA). The detection, determination, and visualization of gains and losses were performed using Affymetrix Chromosome Analysis Suite software (ChAS v3.1.1.27). All obtained data have been uploaded on GEO Omnibus site (GSE134349).

Analysis of The Cancer Genome Atlas (TCGA) Database

Available alteration data (copy number variation, mutation and fusion) for *CDKN2A*, *IFNA2*, *IFNB*, and several genes that encode protein implicated in the IFN-I response were retrieved from cBioPortal, an online portal for accessing data from TCGA project (<http://www.cbioportal.org>).

Transcriptomic Study

MPM cell lines and healthy cells were seeded in six well plates at a density of 0.5×10^6 cells per well. Thereafter, cells were treated with type I IFN or infected with MV at an MOI of 1 for 48 hours. Total cell RNA was

extracted using the Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel). For each sample, a mix of an equal amount of RNA from three separate experiments was used. Transcriptome analysis was performed with Affymetrix human Gene 2.0 ST arrays according to the manufacturer's protocol. Briefly, total RNA (300 ng) was labeled, and cRNA (anti-sense RNA) was synthesized using the Affymetrix WT cDNA Synthesis and Amplification Kit. After cleanup protocol, sense single-stranded DNA was synthesized, fragmented, and labeled with biotin. Biotin sense single-stranded DNA was hybridized onto microarrays according to the manufacturer's instructions. After 16 hours at 45°C, microarrays were washed and stained using Affymetrix fluidics station 450 and scanned with an Affymetrix GeneArray scanner 3000 7G. Raw data were normalized using the Robust Multichip Algorithm in Bioconductor R. Then, all quality controls and statistics were performed using Partek GS (version 6.6 © 2012 Partek Inc., St. Louis, MO). To find differentially expressed genes, classical analysis of variance was performed for each gene and pair-wise Tukey's post hoc tests between groups. The *p* values and fold changes were used to filter and select differentially expressed genes. Interaction, pathway, and functional

enrichment analyses were performed with IPA (Ingenuity Systems, www.ingenuity.com). All data obtained by microarray analysis have been uploaded on the GEO Omnibus site (GSE117668).

Western-Blotting

MPM cell lines were seeded in six well plates at a density of 0.5×10^6 cells per well. Thereafter, cells were treated with IFN-I or infected with MV at an MOI of 1 for 48 hours. Cells were lysed in RIPA buffer containing a Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) and denatured at 95°C for 5 minutes in Laemmli buffer with 10% β -mercaptoethanol. Then, 20 μ g of proteins for cellular lysate were separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis on 8% gels and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. Blots were incubated with anti-MX1 (clone M143, Dr. Georg Kochs, University Medical Center Freiburg, Germany), TLR3, STAT1, XAF-1, RIG-I, RSAD2, OAS1, IFIT-1, or actin primary monoclonal antibodies (Cell Signaling Technology), followed by incubation with HRP-coupled secondary antibodies (Jackson Immuno research). Proteins were revealed using Enhanced Chemiluminescence Detection ECL (Bio-Rad).

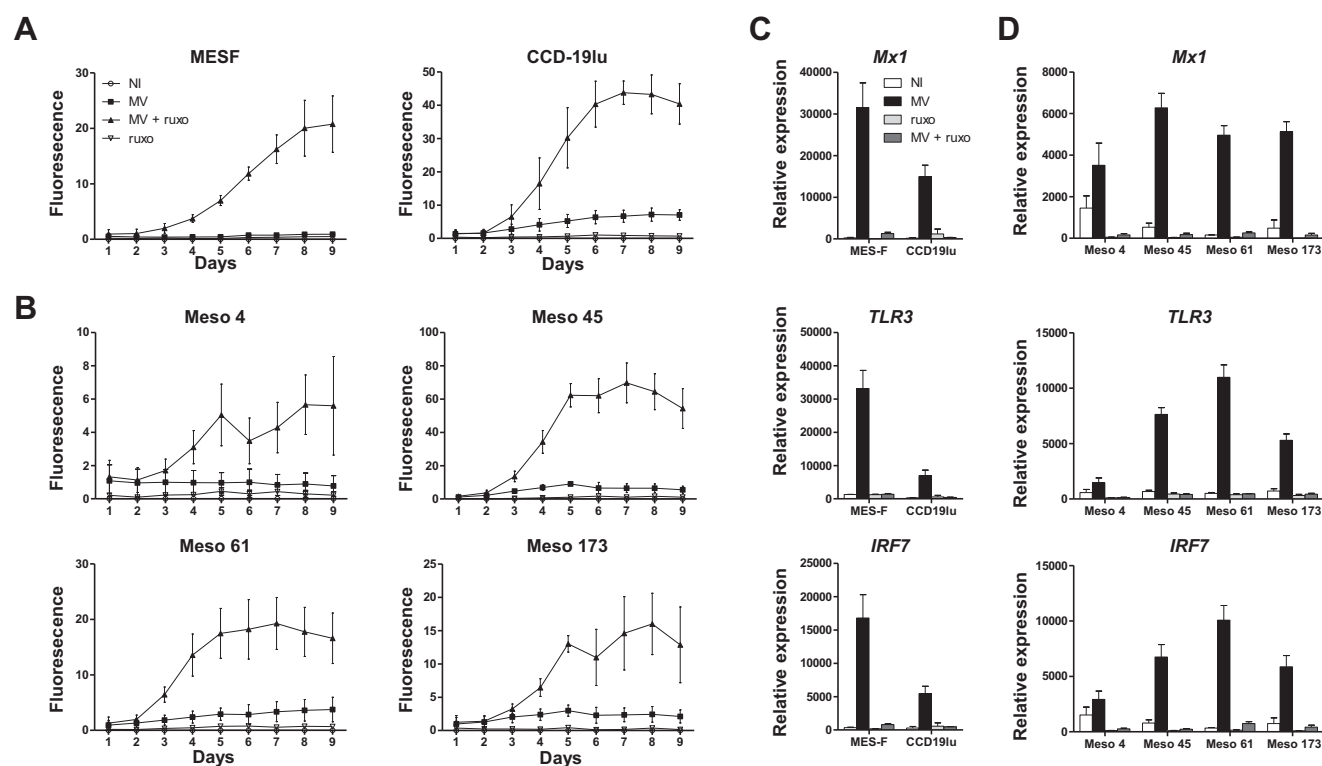
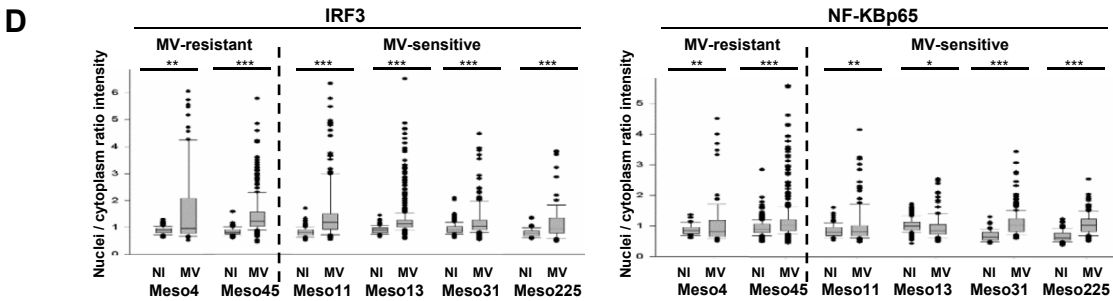
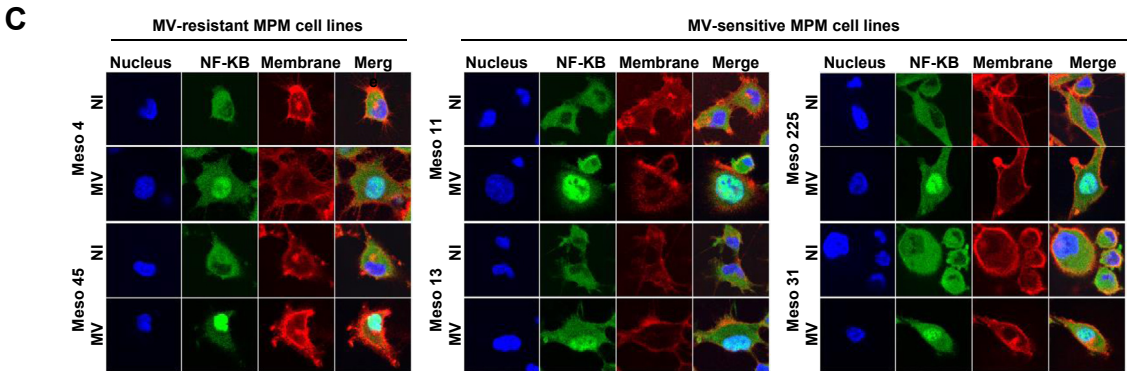
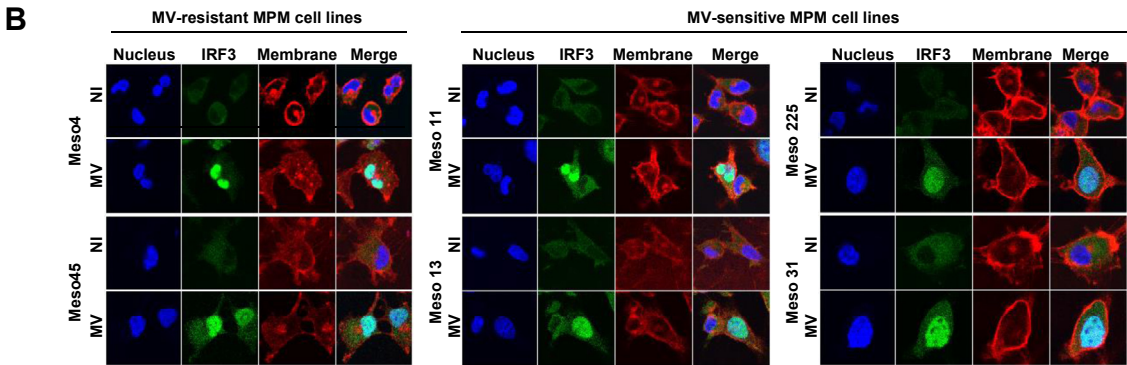
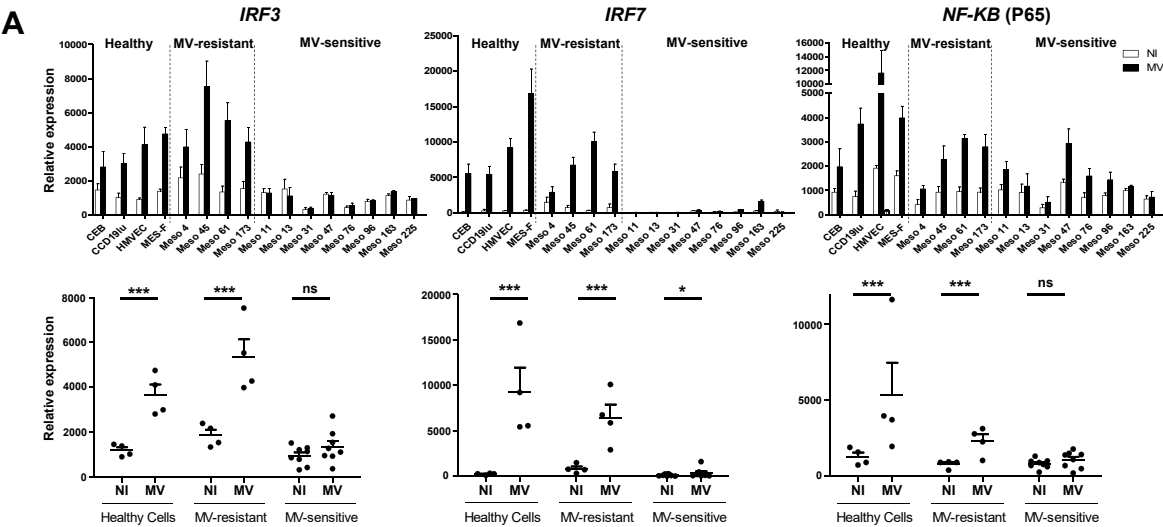


Figure 1. The interferon (IFN) I response controls measles virus (MV) replication and oncolytic activity. Cells were treated 3 days before infection with ruxolitinib (1 μ M) and infected with MV encoding cherry fluorescent protein (MV-ch) (A, B) or with MV (C and D) at multiplicity of infection of one (MOI = 1). Viral replication of MV-ch was followed by measuring cherry fluorescence at 610 nm during 9 days in healthy cells (A) or in MV-resistant malignant pleural mesothelioma (MPM) cell lines (B). Relative RNA expression of three ISGs, *Mx1*, *TLR3*, and *IRF7*, was studied 48 hours after infection by RT-qPCR in healthy cells (C) or in resistant MPM cell lines (D). *RPLP0* gene expression was used as reference and indicated values are means $\pm$ standard error of the mean of relative expression of three independent experiments. NI, noninfected; ruxo, ruxolitinib.



Results

IFN-I Response Controls MV Replication and Oncolytic Activity

In a previous study, we found that the sensitivity of MPM cell lines to MV oncolytic activity depends on defects of the antiviral IFN-I response in tumor cells.¹⁰ To confirm the role of the IFN-I response on MV oncolytic activity, we performed a first experiment in which we exposed four MV-resistant MPM cell lines and two types of healthy cells (MES-F mesothelial cells and CCD-19Lu fibroblast) to MV-ch in the presence of the JAK1 and JAK2 inhibitor ruxolitinib that blocks the IFNAR signaling. We observed that healthy and MPM cells were resistant to MV-ch replication in the absence of ruxolitinib (Fig. 1A and B). This was probably owing to the expression of ISGs because MV induces the expression of *MX1*, *TLR3*, and *IRF7* in healthy and MV-resistant MPM cells (Fig. 1C). However, adding ruxolitinib prevented ISG expression, releasing, therefore, the break on MV replication.

These results prove that MV replication and lytic activity are highly sensitive to a functional IFN-I response and that defects in this signaling pathway in MPM tumor cells make them sensitive to the MV oncolytic activity.

IRF3 and NF-KB Signaling Is Functional in MV-Resistant and MV-Sensitive MPM Cell Lines

We then sought to identify the defects in the IFN-I response affecting MPM cell lines that are sensitive to MV replication. We determined if the IRF3, IRF7, and NF-KB proteins were functional in MV-sensitive MPM cell lines and allowed the signal transduction from PRRs to the nucleus.

First, we assessed the expression of *IRF3*, *IRF7*, and *RELA* genes that encode IRF3, IRF7, and p65, a subunit of NF-KB, respectively (Fig. 2A). *IRF3* and *RELA* were constitutively expressed in all cell groups. *IRF7* was expressed at low basal level in MV-resistant MPM cell lines and barely detectable in healthy cells and MV-sensitive MPM cell lines. Forty-eight hours after exposure to MV, we observed that *IRF3* and *IRF7* expression was increased in healthy cells and MV-resistant MPM cell

lines but was not induced in MV-sensitive MPM cell lines. On the contrary, *RELA* expression increased after MV infection in the three groups. Earlier at 12 hours or 24 hours, we tried to measure the induction of *IRF3*, *IRF7*, and *RELA* expression in response to MV but were unsuccessful (data not shown).

We then studied IRF3 and NF-KBp65 nuclear relocation 12 hours after MV exposure at high MOI by confocal microscopy. Without virus, IRF3 and p65 were not activated and were located mainly in the cytoplasm. After infection, we observed that both transcription factors relocated to the nucleus of MV-resistant MPM cells and to the nucleus of MV-sensitive MPM cells (Fig. 2B and C). No substantial difference in the intensity of nuclear relocation was observed between the two groups (Fig. 2D).

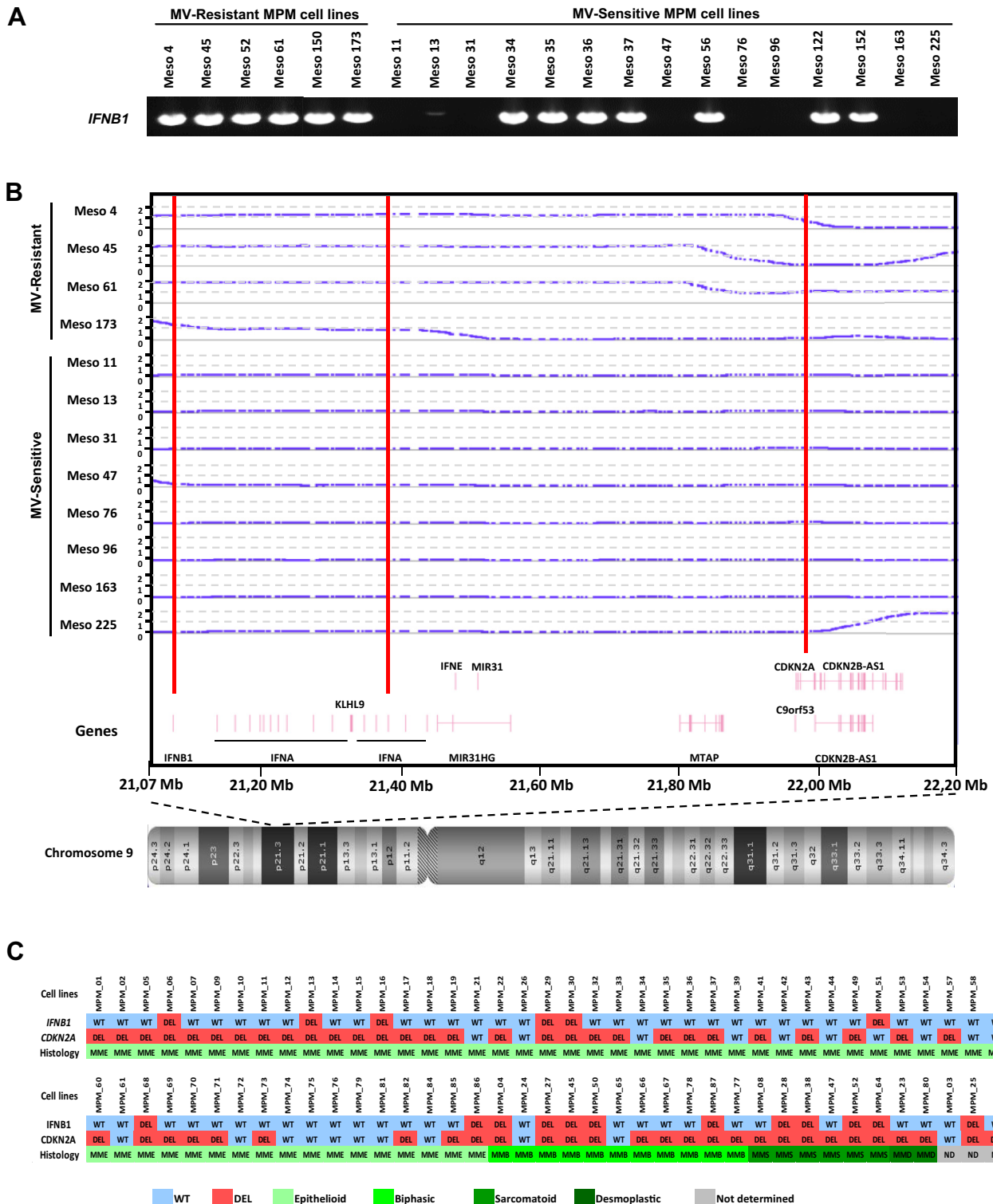
Altogether, these results show that MV is well detected by MPM cell lines, even in cells that failed to produce IFN-I. Detection of MV is then followed by a signal that reaches the nucleus through the relocation of IRF3 and p65 transcription factors.

Most Frequent Defect of the IFN-I Response in MV-Sensitive MPM Cell Lines Is HD of the Genes Encoding IFN- α and IFN- β

Because the PRR signaling is functional in MV-sensitive MPM cell lines, the defects are probably located in the nucleus at the level of genes encoding IFN-I. We thus performed a genomic PCR on six MV-resistant and the 15 MV-sensitive MPM cell lines to assess the presence of the *IFNB1* gene that encodes IFN- β (Fig. 3A). Whereas six MV-resistant and seven MV-sensitive MPM cell lines had at least one copy of the *IFNB1* gene, eight of the 15 MV-sensitive MPM cell lines had a HD of the *IFNB1* gene: Meso 11, Meso 13, Meso 31, Meso 47, Meso 76, Meso 96, Meso 163, and Meso 225.

The *IFNB1* gene is located on the chromosome 9 next to a cluster of 13 genes that encode the IFN- α cytokines and close to the tumor suppressor gene *CDKN2A* that encodes p16^{INK4A} and p14^{ARF} (Fig. 3B). In the next experiment, we measured the size of the deletions of the chromosome 9 region where the *IFNB1* gene is located. We performed a cytogenetic study by Cytoscan that allowed us to analyze the genome of the eight MPM cell

Figure 2. IRF3 and nuclear factor κ B (NF-KB) signaling is functional in measles virus (MV)-sensitive cells. (A) Cells were infected at multiplicity of infection of one (MOI = 1) during 48 hours and *IRF3*, *IRF7*, and *RELA* (NF-KB p65) gene expression was studied by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR) with *RPLP0* gene expression used as reference. Indicated values are means $\pm$ standard error of the mean of relative expression of three independent experiments. NI, noninfected. ns, nonsignificant, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Wilcoxon-Mann-Whitney test); (B) cells were infected at MOI = 10 during 12 hours. Then localization of IRF3 and NF-KBp65 was determined using IRF3- and NF-KBp65-specific monoclonal antibodies and a Dylight 488-conjugated secondary antibodies (green). Membranes were labeled with a lectin marker wheat germ agglutinin (red) and nucleus with Hoescht (blue). Fluorescence was analyzed by confocal microscopy; (C) ratio of the nuclei to cytoplasm fluorescence intensity was measured with the software Volocity software on more than 100 cells.



lines that have lost the *IFNB1* gene and four MV-resistant MPM cell lines (Fig. 3B). This technique covers the entire human genome with specific probes spaced by 1 Kb in average. We observed in the MV-sensitive MPM cell lines that the biallelic deletion of *IFNB1* genes located at the 21.08 Mb position encompassed all the genes encoding the IFN- α cytokines between the 21.17 Mb and 21.44 Mb positions and extend after the *CDKN2A* gene located at the 21.97 Mb position. We also found that the four MV-resistant MPM cell lines had at least one copy of the gene encoding the IFN-I cytokines. However, in three of the four MV-resistant tumor cell lines, two alleles of the *CDKN2A* gene were deleted. Only the cell line Meso 61 conserved one copy of the *CDKN2A* gene.

Then, we sought to confirm the frequent HD of the *CDKN2A* and *IFNB1* genes on another biocollection of 78 short-term-cultured MPM cell lines (Fig. 3C). We found the HD of the *CDKN2A* and *IFNB1* genes in 57 of the 78 MPM cell lines (73%) and 18 of the 78 MPM cell lines (23%), respectively. Seventeen of the 57 MPM cell lines (30%) that had lost the *CDKN2A* gene had also lost the *IFNB1* gene, and 17 of the 18 MPM cell lines (94%) that had lost the *IFNB1* gene had also lost the *CDKN2A* gene (94%). One MPM cell line, MPM_51, lost only two copies of the *IFNB1* gene while keeping the *CDKN2A* gene. Interestingly, the *IFNB1* gene HD was significantly more frequent in MPM with a sarcomatoid component, the most aggressive form of the disease (Fisher's exact test, $p = 0.0085$), that is, 17% of epithelioid MPM, 45% of biphasic MPM, and 50% of sarcomatoid or desmoplastic MPM.

Then, we wanted to determine if other alterations of the IFN-I pathway exist in MPM and to estimate their frequencies. Thus, we looked at the [cbioportal.org](http://www.cbioportal.org) website (<http://www.cbioportal.org>) in the TCGA database on 87 patients with MPM for alterations of *CDKN2A*, *IFNA2*, and *IFNB1* genes, but also at several other genes that encode proteins implicated in the IFN-I response (Fig. 4A). We observed 43.8%, 18.4%, and 9.2% of *CDKN2A*, *IFNA2*, and *IFNB1* genes HD, respectively. We found no other alteration on these genes except one fusion for *CDKN2A*. The genes encoding the other proteins of IFN-I response pathway were rarely altered with two of the 87 patients having a *STAT1* alteration and several patients showing a unique alteration on *DDX58* (RIG-I), *IFIH1* (MDA5), *STAT1*, *STAT2*, *JAK1*, or *JAK2*. The alteration of *DDX58* and *IFIH1* was found in patients with IFN-I genes HD, whereas alterations of *STAT1*, *STAT2*, *JAK1*, or *JAK2* were found in patients without.

To determine if the IFN-I gene HD had a role in MV-replication permissivity, we used CRISPR-cas9 technology and lentiviral transduction to knock out the *IFNB1* genes of the four MV-resistant MPM cell lines to

determine if it was sufficient to make them permissive to MV replication (Supplementary Fig. 1). We found that *IFNB1* inactivation was sufficient to make Meso 45 permissive to MV replication (Supplementary Fig. 1A and B). For the other three cell lines, it was not sufficient, and the inactivation of some of the 13 genes encoding IFN- α may be required (Supplementary Fig. 1C). We also restored the *IFNB1* gene and its promoter in five of the eight IFN-I^{-/-} MPM cell lines by lentiviral transduction. Replication of MV was strongly reduced in four MPM cell lines (Meso 11, Meso 13, Meso 47, and Meso 225) and moderately in the last one (Meso 163) (Supplementary Fig. 2). Altogether, these results show that *IFNB1* expression is often sufficient to block MV replication, but *IFNA* genes may also play a role.

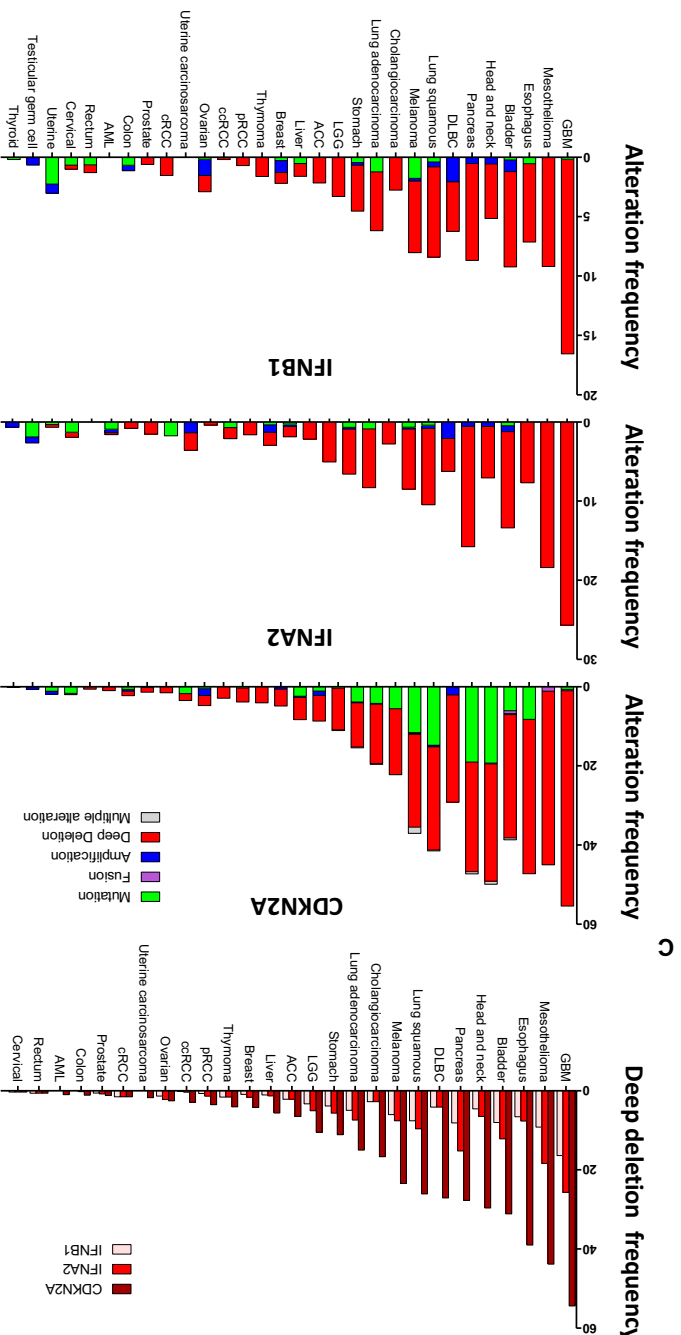
Thereafter, we sought to determine if these HDs are also frequent in other cancers. In the TCGA, we looked at copy number alterations of *CDKN2A*, *IFNA2*, and *IFNB1* genes. Mesothelioma is the second cancer with the most frequent *CDKN2A* HD after glioblastoma multiforme (Fig. 4B and C). Nine types of cancer, including SCLC, have a frequency of *CDKN2A* HD superior to 20% that always correlates with lower frequencies of *IFNA2* and *IFNB1* HD. Mutations of the IFN-I genes, *IFNA2* and *IFNB1*, are rare in all cancers and absent in MPM, meaning that alteration of IFN-I genes in cancer occurs mainly by HD (Fig. 4C).

Because IFN-I gene HDs are also frequent in lung cancer, we used the canSAR database (<https://cansar.icr.ac.uk/cansar>) to randomly select 11 lung cancer cell lines, with four of them having IFN-I genes HD, to determine their permissivity to MV replication (Supplementary Fig. 3). First, we confirmed by genomic PCR that IFN-I genes were absent in the four cell lines (Supplementary Fig. 3A). Then, we exposed the 11 lung tumor cell lines to MV-ch and measured cherry fluorescence during 9 days. We observed that the four IFN-I^{-/-} lung cancer cell lines were permissive to MV replication and that in the presence of IFN-I, this permissivity was lost for three of them (Supplementary Fig. 3B). Five of the seven other lung cancer cell lines with at least one copy of the IFN-I genes were also permissive, suggesting that, as in MPM, defects other than the IFN-I gene HDs affect the IFN-I pathway in lung cancer.

Altogether, these results show that HD of IFN-I genes is frequent in cancers in which *CDKN2A* gene HD is a malignancy driver.

MPM Cell Lines That Have Lost IFN-I Genes Develop a Partial IFN-I Response and a Pro-inflammatory Program After Exposure to MV

We then wanted to characterize how the MPM cell lines that have lost IFN-I encoding genes (IFN-I^{-/-} MPM



cell lines) respond to MV or exogenous IFN-I (IFN- α 2a and IFN- β 1a). Thus, we performed a transcriptomic analysis on four types of healthy primary cells (G1: CCD19Lu fibroblasts, human microvascular endothelial cells (HMVEC), MESF peritoneal mesothelial cells, and CEB lung epithelial cells), four MV-resistant MPM cell lines (G2: Meso 4, Meso 45, Meso 61, and Meso 173), and the eight IFN-I $^{-/-}$ MPM cell lines (G3: Meso 11, Meso 13, Meso 31, Meso 47, Meso 76, Meso 96, Meso 163, and Meso 225) (Fig. 5, Supplementary Fig. 4).

First, we analyzed the expression of genes encoding type I, II, and III IFN and their receptors (Fig. 5A and B). Constitutive expression of these genes was comparable in the three groups (Fig. 5B). After 48 hours of MV exposure, expression of *IFNB1* gene was induced only in some healthy cells (G1) and in resistant MPM lines (G2) and absent in IFN-I $^{-/-}$ MPM cell lines (G3), whereas no expression of the IFNAs genes was observed (Fig. 5A). Expression of type III IFN genes (*IFNL1*, *IFNL2*, and *IFNL3*) was strongly increased after exposition to MV in MPM cell lines (G2 and G3) but not in healthy cells (G1). We also observed that MV had no effect on expression of all IFN receptors. Furthermore, exposure of the different groups to exogenous IFN-I had no effect on the expression of genes encoding type I, II, and III IFN and their receptors.

Then, we investigated the expression of ISGs by the three groups of cells in response to MV or type I IFN (Fig. 5C and D). When healthy cells (G1) and resistant MPM lines (G2) were exposed to MV, we observed the overexpression of a large panel of ISGs (Fig. 5C) that encodes proteins with varied antiviral functions.²³ In response to IFN-I, G1 and G2 expressed a similar set of ISGs, although at a lower level. The MV-resistant MPM cell lines (G2) developed a weaker response to MV and IFN-I compared with that of healthy mesothelial cells, but the basal expression of these genes was often higher in G2 than in G1 (Fig. 5, Supplementary Fig. 4), especially in Meso 4 and to a lower extent Meso 45 and Meso 173 (Fig. 5D). In contrast, the constitutive expression of these genes was lower in IFN-I $^{-/-}$ MPM cell lines (G3) than in healthy mesothelial cells. In response to MV, IFN-I $^{-/-}$ MPM cell lines (G3) expressed a limited set of genes, such as *RSAD2*, *IFIT1*, *OAS1*, and *DDX58* compared with that in G1 and G2 cells (Fig. 5C). Other genes such as *IFI35*, *IFIT1M*, *XAF1*,

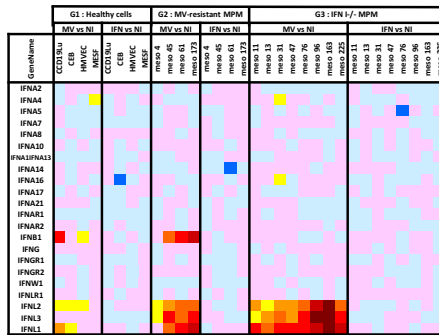
and *TLR3* expressed in response to MV in G1 and G2 but failed to be expressed in G3 cells. However, G3 cell lines were able to express these genes after exposure to IFN-I. Altogether, these results show that IFN-I $^{-/-}$ MPM cell lines (G3) develop a partial IFN-I response characterized by the expression of a limited set of ISGs independently of IFN-I expression that does not succeed in controlling MV replication. The other set of ISGs that requires IFN-I is not expressed in response to MV by IFN-I $^{-/-}$ MPM cell lines, resulting in the absence of MV replication control.

We also detected in G3 a particular set of ISGs that were expressed mainly in response to MV but that were not or weakly expressed in the two other groups of cells, such as *TNFAIP3*, *ATF3*, *IRF1*, and *CCL2* (Fig. 5C and D, lower panels). This result suggests that in the absence of IFN-I, IFN-I $^{-/-}$ MPM cell lines develop an alternative response to MV compared with that of the two other groups of cells. Thus, we analyzed the expression of genes other than ISGs in the three groups in response to MV or exogenous IFN-I (Supplementary Fig. 5), and using Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems), we identified canonical cellular pathways that are induced by the virus in the three groups (Fig. 5E). In G1 and G2, the virus mainly induced pathways that are typical of the IFN-I response such as “Activation of IRF by Cytosolic Pattern Recognition Receptors” and “Interferon Signaling” pathways. In the G3, the IFN-I response was also induced by MV, but we observed that numerous other pathways were activated contrary to G1 and G2. These pathways can be summarized in two main types: an inflammatory response with activated pathways such as “TNFR2 Signaling,” “IL-17A Signaling in Gastric Cells,” “IL-6 Signaling,” “iNOS Signaling,” “Death Receptor Signaling,” and “TNFR1 Signaling,” and an endoplasmic reticulum stress response characterized by activated pathway such as “Unfolded Protein Response,” “Protein Ubiquitination Pathway,” and “Endoplasmic Reticulum Stress Pathway.”

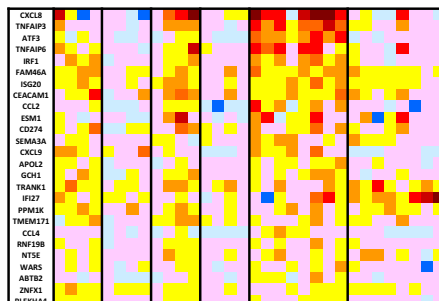
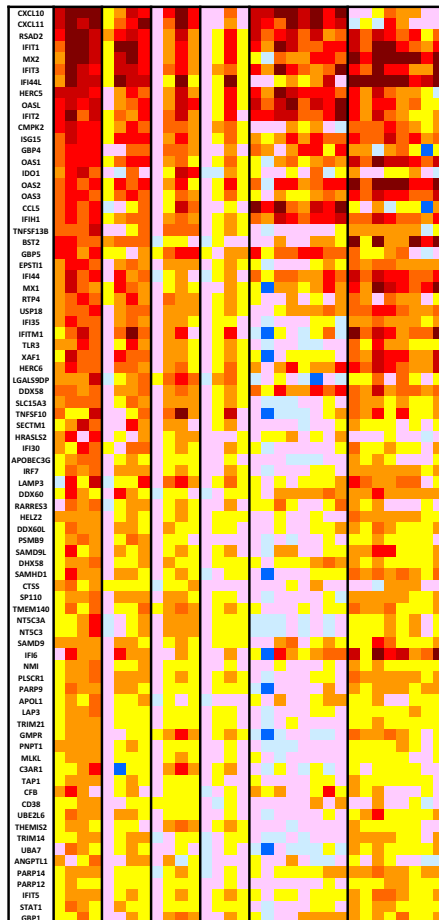
Altogether, these results show that before being lysed by MV, IFN-I $^{-/-}$ MPM cell lines engage transcriptionally in a partial, dysfunctional IFN-I response characterized by the expression of a limited set of ISGs. In addition, these cells develop an inflammatory response associated with an endoplasmic reticulum stress response.

Figure 4. Biallelic deletion of interferon (IFN)-I encoding genes are frequent in mesothelioma and other cancers. (A) Frequency of alteration of genes coding for protein implicated in the IFN-I response in mesothelioma; (B) frequency of *CDKN2A*, *IFNA2*, and *IFNB1* genes biallelic deletions in different types of cancer; and (C) frequency of alteration of *CDKN2A*, *IFNA2*, and *IFNB1* genes in different types of cancer. These results were obtained from The Cancer Genome Atlas database using the cbioportal.org website. ACC, adenoid cystic carcinoma; AML, acute myeloid leukemia; ccRCC, clear renal cell carcinoma; cRCC, chromophobe renal cell carcinoma; DLBC, diffuse large B-cell lymphoma; GBM, glioblastoma multiforme; LGG, low grade glioma; pRCC, papillary renal cell carcinoma.

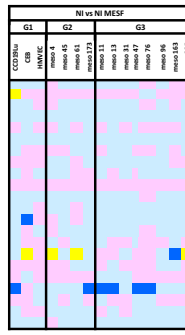
A



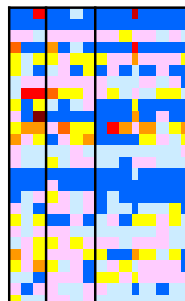
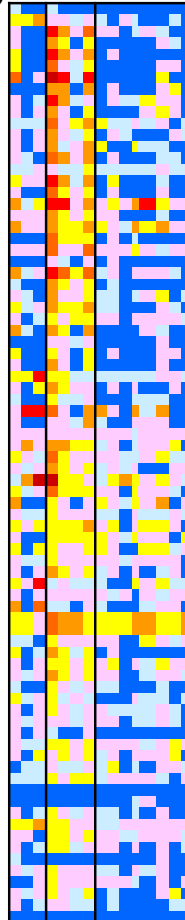
C



B



D



E

Canonical Pathway	MV	G1	G2	G3
Unfolded protein response	0.00	1.22	0.41	0.41
Aldosterone Signaling in Epithelial Cells	0.00	0.00	1.00	1.00
TNFR2 Signaling	0.00	2.14	0.00	0.00
IL-17A Signaling in Gastric Cells	1.30	2.32	0.00	0.00
Glucocorticoid Receptor Signaling	0.00	0.00	0.15	0.15
Activation of IRF by Cytosolic Pattern Recognition Receptors	0.00	0.00	0.15	0.15
Role of Hypercytokinemia/hyperchemokines in the Pathogenesis of Influenza	1.00	2.26	7.73	7.73
Dendritic Cell Maturation	0.00	1.23	2.00	2.00
Protein Ubiquitination Pathway	0.00	0.77	7.32	7.32
PPAR Signaling	0.00	0.00	7.00	7.00
Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses	0.00	0.00	0.00	0.00
Role of RIG-I-like Receptors in Antiviral Innate Immunity	0.00	0.00	0.00	0.00
IL-6 Signaling	0.00	0.00	0.00	0.00
iNOS Signaling	1.00	2.17	0.00	0.00
Interferon Signaling	0.00	0.00	0.00	0.00
Death Receptor Signaling	0.00	0.00	0.00	0.00
Pathogenesis of Multiple Sclerosis	0.00	0.00	0.00	0.00
4-1BB Signaling in T Lymphocytes	0.00	0.00	0.00	0.00
TNFR1 Signaling	0.00	0.00	0.00	0.00
Toll-like Receptor Signaling	0.00	0.00	0.00	0.00
Role of IL-17A in Arthritis	0.00	0.00	0.00	0.00
IL-10 Signaling	0.00	0.00	0.00	0.00
Endoplasmic Reticulum Stress Pathway	0.00	0.00	0.00	0.00
IL-17A Signaling in Fibroblasts	0.00	0.00	0.00	0.00
TREM1 Signaling	0.00	0.00	0.00	0.00
Communication between Innate and Adaptive Immune Cells	0.00	0.00	0.00	0.00
Role of PKR in Interferon Induction and Antiviral Response	0.00	0.00	0.00	0.00
Induction of Apoptosis by HIV1	0.00	0.00	0.00	0.00
PI3K Signaling in B Lymphocytes	0.00	0.00	0.00	0.00
IL-15 Production	0.00	0.00	0.00	0.00
Type I Diabetes Mellitus Signaling	0.00	0.00	0.00	0.00
OX40 Signaling Pathway	0.00	0.00	0.00	0.00
UVA-Induced MAPK Signaling	0.00	0.00	0.00	0.00
Retinoic acid Mediated Apoptosis Signaling	0.00	0.00	0.00	0.00
Inflammasome pathway	0.00	0.00	0.00	0.00
Role of JAK1, JAK2 and TYK2 in Interferon Signaling	0.00	0.00	0.00	0.00
Huntington's Disease Signaling	0.00	0.00	0.00	0.00
Graft-versus-Host Disease Signaling	0.00	0.00	0.00	0.00
Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer Cells	0.00	0.00	0.00	0.00
EIF2 Signaling	0.00	0.00	0.00	0.00
Antigen Presentation Pathway	0.00	0.00	0.00	0.00
Cytotoxic T Lymphocyte-mediated Apoptosis of Target Cells	0.00	0.00	0.00	0.00
Role of Lipids/Lipid Rafts in the Pathogenesis of Influenza	0.00	0.00	0.00	0.00
Allograft Rejection Signaling	0.00	0.00	0.00	0.00
Autoimmune Thyroid Disease Signaling	0.00	0.00	0.00	0.00
Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease	0.00	0.00	0.00	0.00
DNA Double-Strand Break Repair by Homologous Recombination	0.00	0.00	0.00	0.00
Salvage Pathways of Pyrimidine Deoxyribonucleotides	0.00	0.00	0.00	0.00



Partial and Weak Expression of Proteins Encoded by ISGs in IFN- $I^{-/-}$ MPM Cell Lines Exposed to MV

The transcriptomic study pointed out two types of ISGs: the ISGs that are transcribed in response to MV without the presence of IFN-I and the ISGs that are transcribed only in the presence of IFN-I. Thus, in the next experiment, we wanted to confirm the transcriptomic study by qRT-PCR and to measure by Western blot the level of proteins encoded by these two types of ISGs (Fig. 6).

First, we analyzed four ISGs expressed in response to MV without the presence of IFN-I: *RSAD2* (Viperin), *IFIT1* (ISG56), *OAS1*, and *DDX58* (RIG-I). The expression of these ISGs measured by RT-qPCR was increased by both, MV and IFN-I, in IFN- $I^{-/-}$ MPM cell lines, confirming results from the transcriptomic study (Fig. 6A). By Western blot, we observed a stronger basal expression of these proteins in MV-resistant MPM cell lines, especially Meso 4 and Meso 45 compared with IFN- $I^{-/-}$ MPM cell lines, thereby suggesting a constitutively activated IFN-I response in MV-resistant cells (Fig. 6B). The expression of these proteins was up-regulated after exposure to MV or IFN-I in all MV-resistant MPM cell lines. In contrast, in IFN- $I^{-/-}$ MPM cell lines, MV induced only low levels of these proteins, whereas IFN-I induced a higher expression similar to what was observed in MV-resistant cells.

Thereafter, we confirmed by RT-qPCR that the expression of the ISGs *XAF1*, *TLR3*, and *STAT1* was only induced by IFN-I in IFN- $I^{-/-}$ MPM cell lines and not by exposure to MV (Fig. 6C). The proteins encoded by this IFN-I-dependent ISG are also more constitutively expressed in MV-resistant MPM cell lines compared with that in IFN- $I^{-/-}$ MPM cell lines (Fig. 6D). In MV-resistant MPM cell lines, MV and IFN-I induced a strong expression of these proteins. In contrast, except for Meso 163, MV did not induce these proteins in IFN- $I^{-/-}$ MPM cell lines, whereas they were expressed at a high level in response to IFN-I.

Altogether, these results show that IFN- $I^{-/-}$ MPM cell lines develop a weak and partial IFN-I response at the protein level that is not sufficient to control MV replication. They also point out that two of the four MV-resistant MPM cell lines display a high constitutive

level of proteins involved in the antiviral IFN-I response.

Discussion

In this study, we found that the sensitivity of human MPM cells to the attenuated MV oncolytic activity is often caused by the HDs of IFN-I genes. These frequent deletions are associated with the simultaneous HDs of the tumor suppressor gene *CDKN2A* also located in the 9p21.3 chromosome region. These codeletions are frequent in other cancers such as glioblastoma multiforme, melanoma, or SCLC. We also found that IFN- $I^{-/-}$ tumor cells that are sensitive to MV oncolytic activity are able to detect the virus and respond by relocating IRF3 and NF- κ B in the nucleus. Thus, before being lysed by MV, the IFN- $I^{-/-}$ tumor cells engage in a partial IFN-I response characterized by the weak expression of a limited number of ISGs compared with the large panel of ISGs that are expressed by healthy cells and MV-resistant MPM exposed to MV. The IFN- $I^{-/-}$ tumor cells also develop a pro-inflammatory response and endure endoplasmic reticulum stress that are hallmarks of immunogenic cell death. Our work provides a better understanding of MV oncolytic activity against MPM.

Inactivation of the tumor suppressor gene *CDKN2A* is a key driver of mesothelioma.^{16,24} HD of *CDKN2A* and of the IFN-I genes has been described in MPM as early as in the 90s, but these studies mainly focused on the *CDKN2A* locus and failed to estimate the frequency of HDs of the IFN-I gene.^{25,26} In our study, we reported that 36% of the MPM cell lines (eight of 22) from our collection lost both copies of the *IFNB1* gene, whereas they all lost two copies of *CDKN2A* except Meso 61 (data not shown). However, most of these MPM cell lines have more than 10 passages in vitro, and there could be a culture bias that makes *CDKN2A* $^{-/-}$ MPM cell lines easier to establish. To get a more accurate estimation of the frequency of HD of IFN-I genes in MPM, we measured this frequency in a series of 78 short-term MPM cell lines. We found that 73% and 23% of these cell lines lost two copies of *CDKN2A* and *IFNB1* genes, respectively. These percentages probably better reflect the reality as they correspond to the 60% to 74% of *CDKN2A* HD found by fluorescence in situ hybridization.²⁷⁻³⁰ Interestingly,

Figure 5. Partial interferon (IFN-I) and pro-inflammatory response from IFN- $I^{-/-}$ malignant pleural mesothelioma (MPM) cell lines exposed to measles virus (MV). Cells were infected with MV at multiplicity of infection of one (MOI = 1) or treated with IFN-I (IFN- α and IFN- β) during 48 hours. Equal amounts of RNA from three separate experiments were mixed. Transcriptome analysis was performed with Affymetrix human Gene 2.0 ST arrays. (A) Differential expression of the IFN genes and their receptors were analyzed comparing the MV-infected or IFN-I-treated cells with untreated cells; (B) basal expression of the IFN genes and their receptors were analyzed comparing untreated cells with untreated healthy mesothelial cells MESF; (C) differential expression of the interferon-stimulated genes (ISGs) were analyzed comparing the MV-infected or IFN-I-treated cells with untreated cells; (D) basal expression of the ISGs was analyzed comparing untreated cells with untreated healthy mesothelial cells MESF; (E) canonical pathway study was performed with Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems) for each group, and binary logarithm of fold change was defined.

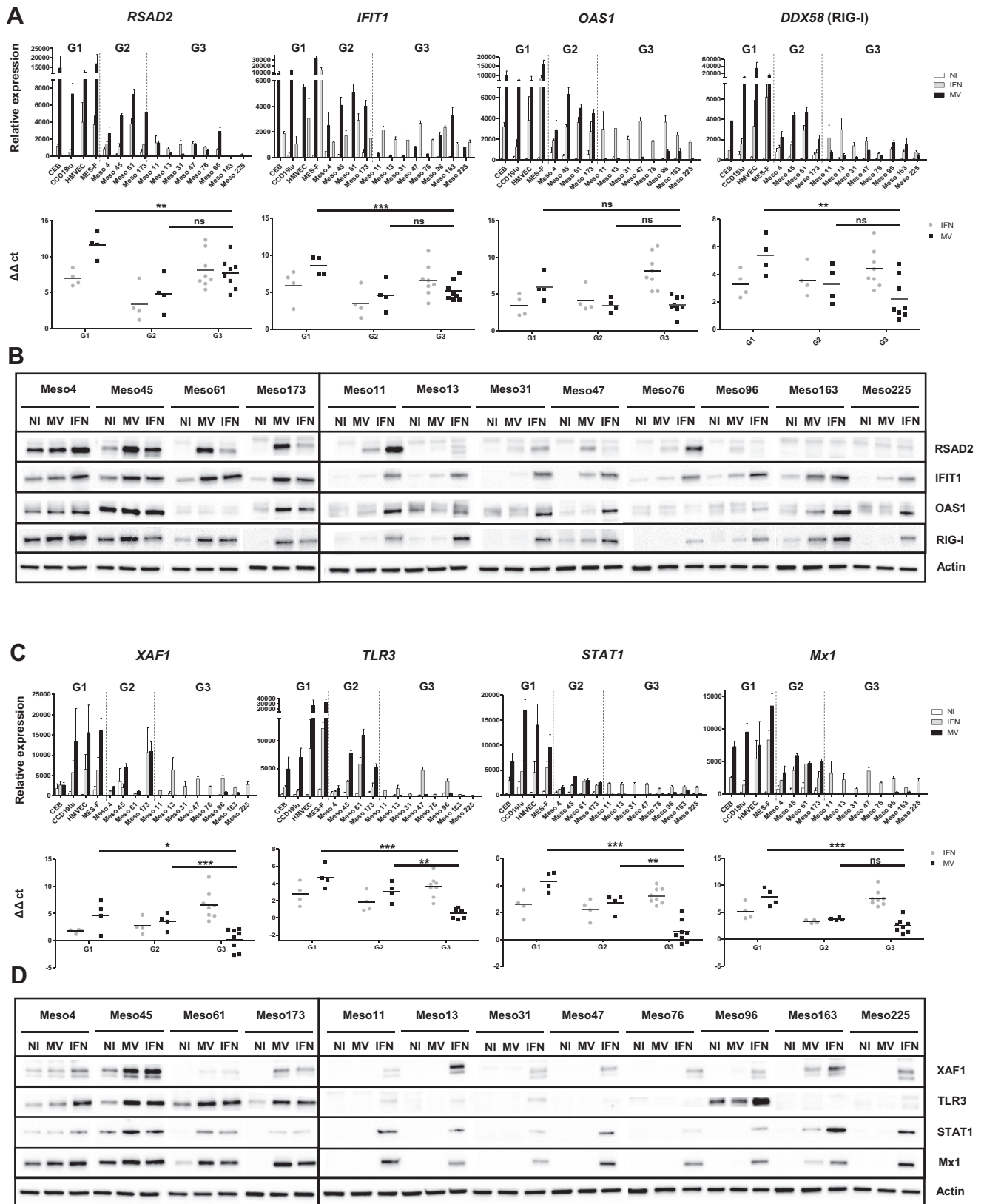


Figure 6. Measles virus (MV) exposure induce a partial and weak expression of proteins encoded by interferon-stimulated genes (ISGs) in interferon (IFN)-I^{-/-} malignant pleural mesothelioma (MPM) cell lines. Cells were infected with MV at multiplicity of infection of one (MOI = 1) or treated with IFN-I (IFN- α and IFN- β) during 48 hours. (A) RNA expression of four ISGs induced by MV in IFN-I^{-/-} MPM cells (*RSAD2*, *IFIT1*, *OAS1*, and *DDX58*) analyzed by reverse-transcriptase polymerase chain

IFNB1 HDs are more frequent in mesothelioma cell lines with a sarcomatoid component (biphasic, sarcomatoid, and desmoplastic MPM) with 47% of them harboring these deletions. In the TCGA public database, we found that 43.8% and 9.2% of MPM frozen tumor samples lost two copies of *CDKN2A* and *IFNB1* genes, respectively. However, these results are likely underestimated because they are obtained by high-throughput sequencing of tumor biopsies that contain healthy cells that can hide HDs only present in tumor cells as it was found for the *BAP1* gene, also frequently deleted in MPM.³¹

HD of IFN-I genes is not the only defect of the IFN-I response in MPM. Indeed, seven of the 15 MV-sensitive cell lines have at least one copy of the *IFNB1* gene. Three of them behaved similar to IFN-I^{-/-} MPM cell lines by failing to produce IFN-I in response to MV, whereas the other four produced IFN-I in response to MV but failed to control viral replication.¹⁰ This converging selection of tumor cells toward inactivation of the IFN-I response strongly suggests that the HDs of IFN-I genes are not just a collateral damage of the loss of the *CDKN2A* locus but probably bring additional advantages for tumor development in MPM.

Among cancers that have lost IFN-I genes, glioblastoma multiforme displays the highest frequency of these HDs (16.4% for *IFNB1*, and 25.7% for *IFNA2*). This cancer is also one of the most studied for oncolytic immunotherapy with different viruses such as herpes simplex, adenovirus, and parvovirus.^{32,33} Recently, the group of Evanthia Galanis³⁴ reported in human tumor xenograft models in mice and by monitoring 10 patients with glioblastoma receiving MV oncolytic immunotherapy that the main transcriptional signature associated with resistance was the presence of a constitutive activation of the IFN-I response in tumor cells. This gene signature can be used to predict which patients are likely to respond to MV oncolytic immunotherapy. We also found a constitutive activation of the type I IFN pathway in several MV-resistant MPM cell lines compared with that in healthy cells, whereas none of the eight IFN-I^{-/-} MPM cell lines presented a constitutive activation of the IFN-I pathway.

In four of five IFN-I^{-/-} MPM cell lines, restoration of the *IFNB1* genes led to the blocking of MV

replication without the need to restore *IFNA* genes, whereas in the last one, blocking was partial and may require restoration of some *IFNA* genes. We focused on the *IFNB1* gene because after 48 hours of MV exposure, it was the most expressed IFN-I gene in resistant MPM cell lines. We also inactivated the *IFNB1* genes in the four MV-resistant MPM cell lines, and only one tumor cell line became permissive to MV replication. Inactivation of *IFNB1* gene was not sufficient for the other three cell lines. Altogether, these results reveal a major contribution of the *IFNB1* gene in controlling MV replication, but *IFNA* genes may also play a role.

In the absence of IFN-I genes, MPM cell lines exposed to MV develop a weak and partial IFN-I response characterized by the expression of a limited number of ISGs, such as *RSAD2*, *IFIT1*, *OAS1*, and *DDX58*. They fail to express other ISGs, such as *XAF1*, *TLR3*, *STAT1*, and *MX1* that need the presence of IFN-I to be expressed. This group of ISGs that can be directly activated by IRF3 independently of IFN-I as a part of the early antiviral response is not sufficient to control MV replication. In addition to this weak and partial IFN-I response, IFN-I^{-/-} MPM cell lines also develop a pro-inflammatory response such as TNFR1/TNFR2, IL-17A, IL-6, iNOS signaling, and endoplasmic reticulum stress. This corroborates the in vivo model described by the group of Michael Diamond,³⁵ in which IFNAR^{-/-} myeloid cells that are equivalent to the IFN-I^{-/-} MPM cell lines in our study developed an exacerbated pro-inflammatory TNF- α response when infected by the West Nile virus. Our study and that of the Michael Diamond group show that in the absence of the IFN-I signaling, the pro-inflammatory response is amplified. This pro-inflammatory response and the stress of the endoplasmic reticulum are probably part of the immunogenic cell death induced by MV replication. We and others found that tumor cells lysed by MV are immunogenic by releasing tumor-associated antigens and danger signals from cellular or viral origins.³⁶⁻⁴³ These signals induce the maturation of myeloid and plasmacytoid dendritic cells that are, in turn, able to cross-present tumor antigens to T cells. Thus, our study identifies the frequent HDs of IFN-I genes as a therapeutic target to induce cell death of tumor cells with oncolytic MV for the treatment of MPM.

reaction (RT-qPCR) with *RPLPO* gene expression used as reference. Results are expressed as means $\pm$ standard error of the mean (SEM) of relative expression of three independent experiments and are also expressed as $\Delta\Delta Ct$ between conditions MV and noninfected (NI) (MV), and conditions IFN-I and NI (IFN-I). ns, nonsignificant, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, one-way ANOVA (Kruskal-Wallis test); (B) protein expression of interferon-stimulated genes (ISGs) induced by MV in IFN-I^{-/-} MPM cells (*RSAD2*, *IFIT1*, *OAS1*, and *RIG-I*) analyzed by Western blot with actin protein expression used as a reference; (C) RNA expression of four ISGs that are not induced by MV in IFN-I^{-/-} MPM cells (*XAF-1*, *TLR3*, *STAT1*, and *Mx1*) analyzed by RT-qPCR with *RPLPO* gene expression used as reference. Results are expressed as means $\pm$ SEM of relative expression of three independent experiments; (D) protein expression of ISGs that are not induced by MV in IFN-I^{-/-} MPM cells (*XAF-1*, *TLR3*, *STAT1*, and *Mx1*) analyzed by Western blot with actin protein expression used as a reference.

Acknowledgments

We thank Philippe Hulin and the cellular and tissular core facility of Nantes University (MicroPiCell) for their expertise in video microscopy. We thank Juliette Desfrancois and the core facility of flow cytometry (Cytocell). We thank Elise Douillard, Magali Devic, Emilie Maurenton, and Nathalie Roi for excellent technical expertise on genomic analysis. We also thank Sébastien Jacques and the genomic core facility of Institut Cochin (Genom'ic). This work was supported by La Ligue Régionale Grand Ouest contre le Cancer (CSIRGO: CD16, CD22, CD41, CD44, CD49, CD72, CD79, and CD85), La Ligue Nationale contre le Cancer, L'association ARSMESO44, La Fondation du Souffle et le Fonds de Dotation Recherche en Santé Respiratoire, La fondation ARC, La Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), L'Agence Nationale pour la Recherche (ANR-16-CE18-0016), bourse Roche de Recherche 2015 en Oncologie Thoracique, INSERM, and LabEX IGO program supported by the National Research Agency through the investment of the future program ANR-11-LABX-0016-01. Dr. Delaunay was supported by a grant from Ligue Contre le Cancer. Dr. Quetel was supported by grants from Cancéropôle Région Île-de-France.

Supplementary Data

Note: To access the supplementary material accompanying this article, visit the online version of the *Journal of Thoracic Oncology* at www.jto.org and at <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.12.128>.

References

- Achard C, Surendran A, Wedge ME, Ungerechts G, Bell J, Ilkow CS. Lighting a fire in the tumor micro-environment using oncolytic immunotherapy. *EBio-Medicine*. 2018;31:17-24.
- Russell SJ, Peng KW, Bell JC. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol*. 2012;30:658-670.
- Guillermé JB, Gregoire M, Tangy F, Fonteneau JF. Anti-tumor virotherapy by attenuated measles virus (MV). *Biology (Basel)*. 2013;2:587-602.
- Robinson S, Galanis E. Potential and clinical translation of oncolytic measles viruses. *Expert Opin Biol Ther*. 2017;17:353-363.
- Dorig RE, Marciel A, Chopra A, Richardson CD. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell*. 1993;75:295-305.
- Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, et al. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol*. 1993;67:6025-6032.
- Fishelson Z, Donin N, Zell S, Schultz S, Kirschfink M. Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. *Mol Immunol*. 2003;40:109-123.
- Ravindranath NM, Shuler C. Expression of complement restriction factors (CD46, CD55 & CD59) in head and neck squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med*. 2006;35:560-567.
- Anderson BD, Nakamura T, Russell SJ, Peng KW. High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus. *Cancer Res*. 2004;64:4919-4926.
- Achard C, Boisgerault N, Delaunay T, et al. Sensitivity of pleural mesothelioma to oncolytic measles virus depends on defects of the type I interferon response. *Oncotarget*. 2015;6:44892-44904.
- Berchtold S, Lampe J, Weiland T, et al. Innate immune defense defines susceptibility of sarcoma cells to measles vaccine virus-based oncolysis. *J Virol*. 2013;87:3484-3501.
- Noll M, Berchtold S, Lampe J, Malek NP, Bitzer M, Lauer UM. Primary resistance phenomena to oncolytic measles vaccine viruses. *Int J Oncol*. 2013;43:103-112.
- Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:513-545.
- Grandvaux N, Servant MJ, tenOever B, et al. Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes. *J Virol*. 2002;76:5532-5539.
- Nakaya T, Sato M, Hata N, et al. Gene induction pathways mediated by distinct IRFs during viral infection. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;283:1150-1156.
- Yap TA, Aerts JG, Popat S, Fennell DA. Novel insights into mesothelioma biology and implications for therapy. *Nat Rev Cancer*. 2017;17:475-488.
- Gueugnon F, Leclercq S, Blanquart C, et al. Identification of novel markers for the diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Am J Pathol*. 2011;178:1033-1042.
- Hackett TL, Warner SM, Stefanowicz D, et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition in primary airway epithelial cells from patients with asthma by transforming growth factor-beta1. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180:122-133.
- de Reyniès A, Jaurand MC, Renier A, et al. Molecular classification of malignant pleural mesothelioma: identification of a poor prognosis subgroup linked to the epithelial-to-mesenchymal transition. *Clin Cancer Res*. 2014;20:1323-1334.
- Tranchant R, Quetel L, Tallet A, et al. Co-occurring mutations of tumor suppressor genes, *LATS2* and *NF2*, in malignant pleural mesothelioma. *Clin Cancer Res*. 2017;23:3191-3202.
- Combredet C, Labrousse V, Mollet L, et al. A molecularly cloned Schwarz strain of measles virus vaccine induces strong immune responses in macaques and transgenic mice. *J Virol*. 2003;77:11546-11554.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9:676-682.
- Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, et al. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature*. 2011;472:481-485.
- Jean D, Daubriac J, Le Pimpec-Barthes F, Galateau-Salle F, Jaurand MC. Molecular changes in mesothelioma

- with an impact on prognosis and treatment. *Arch Pathol Lab Med*. 2012;136:277-293.
25. Cheng JQ, Jhanwar SC, Klein WM, et al. p16 alterations and deletion mapping of 9p21-p22 in malignant mesothelioma. *Cancer Res*. 1994;54:5547-5551.
 26. Xio S, Li D, Vijg J, Sugarbaker DJ, Corson JM, Fletcher JA. Codeletion of p15 and p16 in primary malignant mesothelioma. *Oncogene*. 1995;11:511-515.
 27. Monaco SE, Shuai Y, Bansal M, Krasinskas AM, Dacic S. The diagnostic utility of p16 FISH and GLUT-1 immunohistochemical analysis in mesothelial proliferations. *Am J Clin Pathol*. 2011;135:619-627.
 28. Chiosea S, Krasinskas A, Cagle PT, Mitchell KA, Zander DS, Dacic S. Diagnostic importance of 9p21 homozygous deletion in malignant mesotheliomas. *Mod Pathol*. 2008;21:742-747.
 29. Dacic S, Kothmaier H, Land S, et al. Prognostic significance of p16/cdkn2a loss in pleural malignant mesotheliomas. *Virchows Arch*. 2008;453:627-635.
 30. Illei PB, Rusch VW, Zakowski MF, Ladanyi M. Homozygous deletion of CDKN2A and codeletion of the methylthioadenosine phosphorylase gene in the majority of pleural mesotheliomas. *Clin Cancer Res*. 2003;9:2108-2113.
 31. Yoshikawa Y, Emi M, Hashimoto-Tamaoki T, et al. High-density array-CGH with targeted NGS unmask multiple noncontiguous minute deletions on chromosome 3p21 in mesothelioma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113:13432-13437.
 32. Kaufmann JK, Chiocca EA. Glioma virus therapies between bench and bedside. *Neuro Oncol*. 2014;16:334-351.
 33. Marchini A, Bonifati S, Scott EM, Angelova AL, Rommelaere J. Oncolytic parvoviruses: from basic virology to clinical applications. *Virol J*. 2015;12:6.
 34. Kurokawa C, Iankov ID, Anderson SK, et al. Constitutive interferon pathway activation in tumors as an efficacy determinant following oncolytic virotherapy. *J Natl Cancer Inst*. 2018;110:1123-1132.
 35. Pinto AK, Ramos HJ, Wu X, et al. Deficient IFN signaling by myeloid cells leads to MAVS-dependent virus-induced sepsis. *PLoS Pathog*. 2014;10:e1004086.
 36. Delaunay T, Violland M, Boisgerault N, et al. Oncolytic viruses sensitize tumor cells for NY-ESO-1 tumor antigen recognition by CD4+ effector T cells. *Oncoimmunology*. 2017;7:e1407897.
 37. Achard C, Boisgerault N, Delaunay T, et al. Induction of immunogenic tumor cell death by attenuated oncolytic measles virus. *J Clin Cell Immunol*. 2015;6:291.
 38. Achard C, Guillerme JB, Bruni D, et al. Oncolytic measles virus induces tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated cytotoxicity by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Oncoimmunology*. 2016;6:e1261240.
 39. Donnelly OG, Errington-Mais F, Steele L, et al. Measles virus causes immunogenic cell death in human melanoma. *Gene Ther*. 2013;20:7-15.
 40. Gauvrit A, Brandler S, Sapède-Pérez C, Boisgerault N, Tangy F, Grégoire M. Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response. *Cancer Res*. 2008;68:4882-4892.
 41. Guillerme JB, Boisgerault N, Roulois D, et al. Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Clin Cancer Res*. 2013;19:1147-1158.
 42. Fonteneau JF, Guillerme JB, Tangy F, Grégoire M. Attenuated measles virus used as an oncolytic virus activates myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Oncoimmunology*. 2013;2, e24212.
 43. Galanis E, Atherton PJ, Maurer MJ, et al. Oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter to treat drug-resistant ovarian cancer. *Cancer Res*. 2015;75:22-30.



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

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

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

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

OPEN ACCESS

Edited by:

Emanuela Felley-Bosco,
University of Zurich, Switzerland

Reviewed by:

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

*Correspondence:

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

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

Specialty section:

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

Received: 15 April 2021

Accepted: 07 June 2021

Published: 24 June 2021

Citation:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

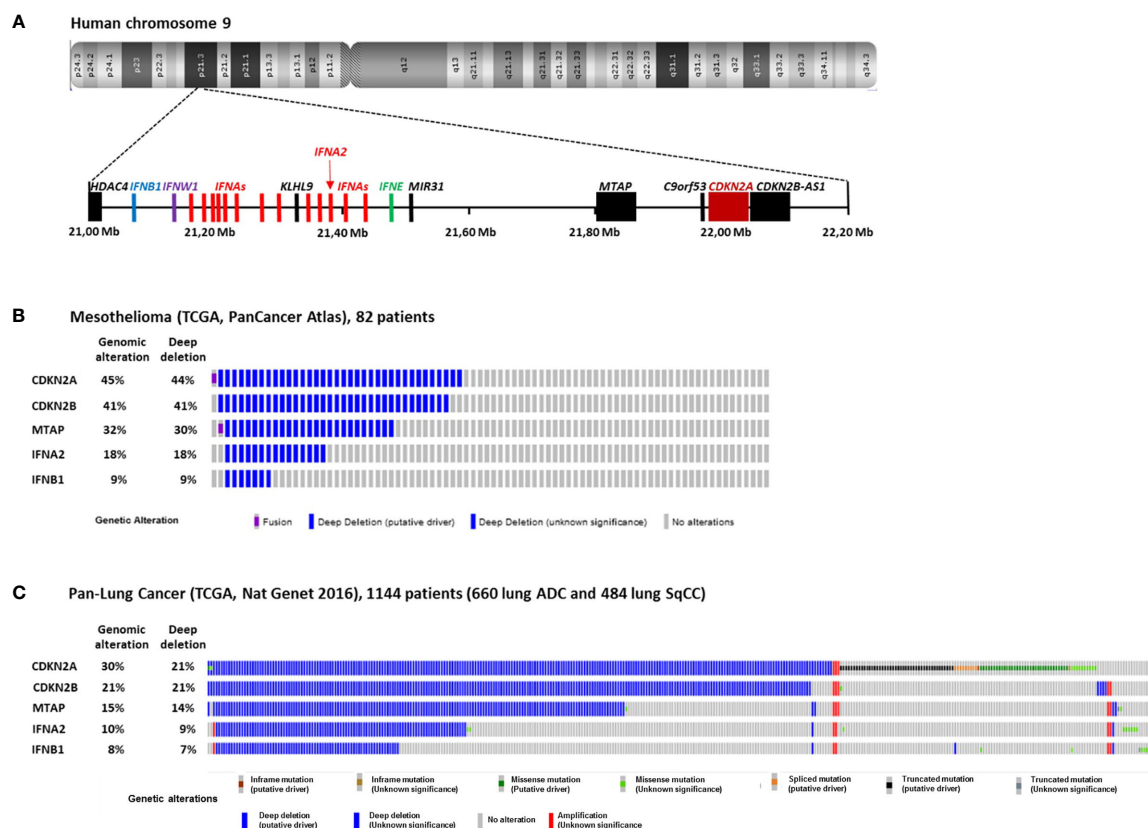


FIGURE 1 | Homozygous Deletions in the p21.3 region of chromosome 9 in MPM and NSCLC. **(A)** Schematic representation of genes present in the p21.3 region of chromosome 9 between positions 21,000,000 and 22,200,000 drawn from UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>). **(B)** Oncoprint representation of *CDKN2A*, *CDKN2B*, *MTAP*, *IFNA2* and *IFNB1* genomic alterations found in tumor samples of 82 MPM patients. Oncoprint was performed with cbiportals website (<http://www.cbiportal.org/>) using TCGA PanCancer atlas data. **(C)** Oncoprint representation of *CDKN2A*, *CDKN2B*, *MTAP*, *IFNA2* and *IFNB1* genomic alterations found in tumor samples of 1144 NSCLC patients. Oncoprint was performed with cbiportals website (<http://www.cbiportal.org/>) using TCGA Pan lung cancer data. Only the patients with at least one genomic alteration in the five genes are shown. ADC, adenocarcinoma; SqCC, squamous cell carcinoma.

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

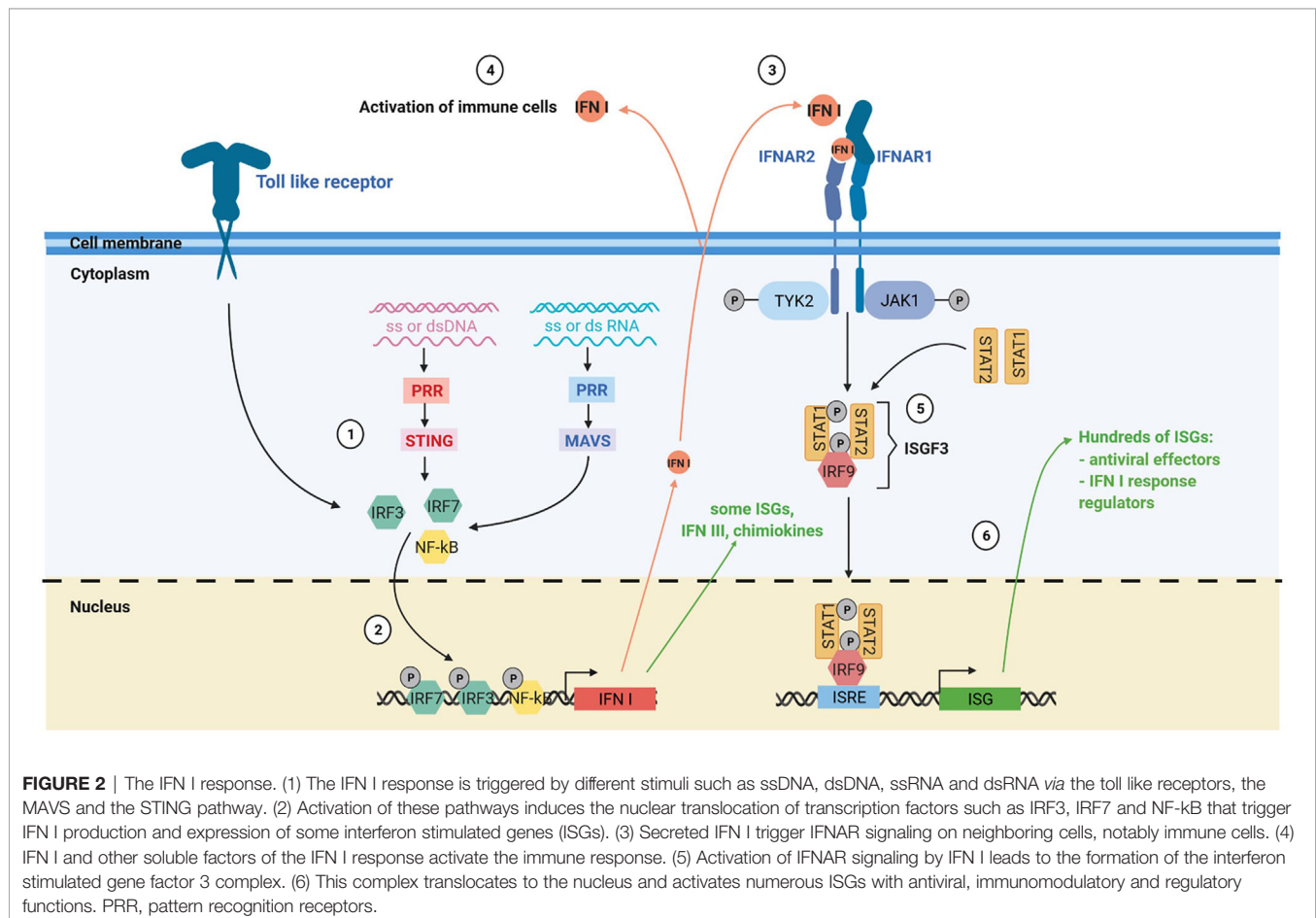
THE TYPE I INTERFERON RESPONSE IN THORACIC CANCERS

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

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

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

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



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

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

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

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

POTENTIAL CONSEQUENCES OF IFN I GENES HD FOR THORACIC CANCERS THERAPY

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

AUTHOR CONTRIBUTIONS

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

FUNDING

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

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

ACKNOWLEDGMENTS

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

REFERENCES

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

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

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

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

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



Review

Apoptosis during ZIKA Virus Infection: Too Soon or Too Late?

Jonathan Turpin ^{1,†} , Daed El Safadi ^{1,†}, Grégoire Lebeau ^{1,†} , Morgane Krejbich ², Camille Chatelain ²,
Philippe Desprès ¹ , Wildriss Viranaïcken ¹ and Pascale Krejbich-Trotot ^{1,*}

¹ Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT), Université de La Réunion, INSERM UMR 1187, CNRS 9192, IRD 249, Plateforme CYROI, 97490 Sainte-Clotilde, France; jonathan.turpin@univ-reunion.fr (J.T.); daedalsafadi@gmail.com (D.E.S.); gregorie.lebeau@univ-reunion.fr (G.L.); philippe.despres@univ-reunion.fr (P.D.); wildriss.viranaïcken@univ-reunion.fr (W.V.)

² CRCI2NA, Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie, Université de Nantes, Université d'Angers, INSERM UMR 1307, 44000 Nantes, France; morgane.krebich@etu.univ-nantes.fr (M.K.); camille.chatelain@etu.univ-nantes.fr (C.C.)

* Correspondence: pascale.krebich@univ-reunion.fr

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Cell death by apoptosis is a major cellular response in the control of tissue homeostasis and as a defense mechanism in the case of cellular aggression such as an infection. Cell self-destruction is part of antiviral responses, aimed at limiting the spread of a virus. Although it may contribute to the deleterious effects in infectious pathology, apoptosis remains a key mechanism for viral clearance and the resolution of infection. The control mechanisms of cell death processes by viruses have been extensively studied. Apoptosis can be triggered by different viral determinants through different pathways as a result of virally induced cell stresses and innate immune responses. Zika virus (ZIKV) induces Zika disease in humans, which has caused severe neurological forms, birth defects, and microcephaly in newborns during the last epidemics. ZIKV also surprised by revealing an ability to persist in the genital tract and in semen, thus being sexually transmitted. Mechanisms of diverting antiviral responses such as the interferon response, the role of cytopathic effects and apoptosis in the etiology of the disease have been widely studied and debated. In this review, we examined the interplay between ZIKV infection of different cell types and apoptosis and how the virus deals with this cellular response. We illustrate a duality in the effects of ZIKV-controlled apoptosis, depending on whether it occurs too early or too late, respectively, in neuropathogenesis, or in long-term viral persistence. We further discuss a prospective role for apoptosis in ZIKV-related therapies, and the use of ZIKV as an oncolytic agent.

Keywords: apoptosis; cell death; Zika virus; ZIKV



Citation: Turpin, J.; El Safadi, D.; Lebeau, G.; Krejbich, M.; Chatelain, C.; Desprès, P.; Viranaïcken, W.; Krejbich-Trotot, P. Apoptosis during ZIKA Virus Infection: Too Soon or Too Late? *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1287. <https://doi.org/10.3390/ijms23031287>

Academic Editor: Francisco Estévez

Received: 29 December 2021

Accepted: 21 January 2022

Published: 24 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The recent COVID pandemic reminds us of how vulnerable the world's population is to zoonotic RNA viruses of medical concern. Between 2007 and 2016, the emergence of epidemic strains of mosquito-borne Zika virus (ZIKV), a member of the flavivirus genus of *Flaviviridae* family, was in the spotlight. [1]. At that time, the rapid expansion of the Zika epidemic throughout the intertropical zone had already received international attention. Health authorities from several countries were concerned and had to deal with a disease whose clinical outcomes such as congenital syndromes and microcephaly in infants were more severe and frequent than previously known [2]. The international scientific community had to react to a poorly documented infectious agent whose interactions with its hosts (human or mosquitoes), pathogenesis, and unusual transmission pathways had been only partially or not described [3].

The pathogenicity of an infectious agent depends largely on the cytopathic effects it will produce in its target cells. In contrast, programmed cell death (PCD) is an urgent and

necessary defense response, implemented by the infected host to disrupt virus multiplication and propagation, thereby preserving other cells and surrounding tissue [4]. The death of infected cells by apoptosis also plays a crucial role in promoting antigen presentation and recruiting immune cells, thus facilitating the infection resolution [5,6]. Failures in viral clearance are widely attributed to defects in the infected cells' auto-destruction [7].

Despite the tissue damage and the subsequent critical loss of cell populations, PCD by apoptosis is thus considered a 'necessary evil' of the body's response in its efforts to get rid of the infectious agent.

In the case of ZIKV infection and pathogenesis, massive apoptosis of neuronal progenitor cells (NPCs), early in fetal development, has been proposed as an explanation for the specific induced central nervous system (CNS) disorders in newborns and infants [8,9]. At the same time, the finding that ZIKV can persist in adults in the urinary and reproductive tracts and semen, for many months after the acute infection episode, is an indication that viral clearance may be incomplete and associated with impaired or delayed apoptosis [10].

In this review, we propose examining the available data on ZIKV-induced apoptosis and the state of knowledge regarding the virus's ability to manipulate, delay, or inhibit the cell death response. We also discuss antiviral therapies based on the remediation of apoptosis, and given its unique dual relationship with cell death, the possibility of using ZIKV as an oncolytic agent.

2. Apoptotic Cell Death

2.1. Features of Apoptosis

Apoptosis is one of the genetically programmed cell deaths that regulates tissue homeostasis and aims to eliminate non-viable, stressed, injured, or infected cells [11]. Cell death by apoptosis is a process defined by canonical morphological and molecular criteria. Apoptosis induces specific morphological changes that lead to cell implosion and disappearance. This is supported by the condensation and fragmentation of the nucleus (pyknosis and karyorrhexis), followed by plasma membrane blebbing and cell disassembly [12]. The process ends by efferocytosis, with cell residues such as blebs or apoptotic bodies being engulfed by non-dying neighboring cells or professional phagocytes [13]. At the molecular level, the caspase family of proteases is required for the completion of the operation, which entails initiation and execution phases [14]. Mitochondria plays a major role in the initiation of apoptosis through the permeabilization of its outer membrane (MOMP) [15]. The members of the BCL-2 protein family are the main actors of the MOMP (Figure 1). Among the family are proteins with the BH3 domain only (e.g., BID, BIM, NOXA, BAD), which activate or control other BCL-2 proteins (the pro-apoptotic BAX and BAK) to initiate the complex formation required for MOMP, while anti-apoptotic regulators such as BCL-2, BCL-XL, and MCL-1 inhibit its formation [16]. MOMP leads to the release of cytochrome-c from the mitochondria and the activation of the protein apoptosis protease activating factor 1 (APAF-1). Oligomerized cytochrome-c-APAF-1, together with pro-caspase-9, form a macromolecular complex called apoptosome [17]. Activated caspase-9 from the apoptosome complex will then process the executioner pro-caspase-3 into active caspase-3, which in turn degrades numerous substrates such as poly ADP-ribose polymerase (PARP) [18].

Several typical situations are capable of initiating apoptosis (Figure 1). Receiving death signals activates the extrinsic pathway through TNF receptors (TNFR) and Fas receptors (CD95) and leads to death-inducing signaling complex (DISC) formation and activation of caspase-8. This initiating caspase can activate BID, which will then activate the mitochondrial pathway [19,20]. Cell stresses decompensations, damages of physico-chemical origin (UV, drugs, reactive oxygen species) or following endoplasmic reticulum (ER) stress, and an unresolved unfolded protein response (UPR), lead to an intrinsic pathway of apoptosis with mitochondrial membrane modifications and caspase-9 activation [21,22].

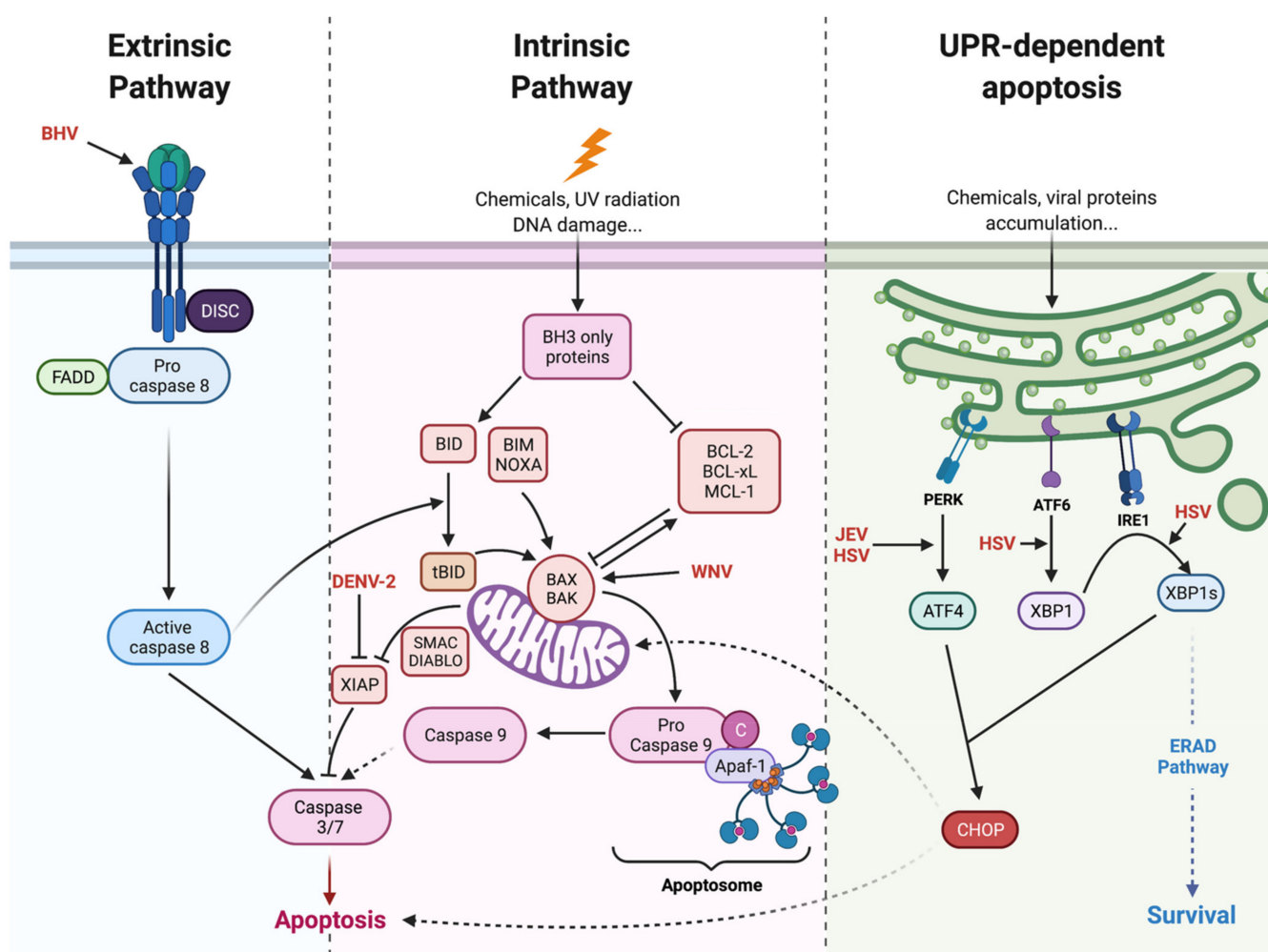


Figure 1. The different pathways of apoptosis. Apoptosis can follow several pathways, depending on the signals integrated by the cell and the respective influence of the mobilized pro- and anti-apoptotic factors. The extrinsic pathway is induced by external death signals such as $\text{TNF}\alpha$ and mediated by death receptors (FAS, DR4 expressed on the cell surface). The intrinsic pathway is induced by internal stimuli such as DNA damage, oxidative stress, or intracellular parasites. Apoptosis could also be activated by unresolved endoplasmic reticulum stress (ER stress) and unfolded protein response (UPR) through C/EBP HOMologous Protein (CHOP) [15–22]. Viruses such as BHV, DENV, WNV, JEV, and HSV (in red) can induce apoptosis by the activation of different pathways [23–35].

2.2. Virus-Induced Apoptosis

Each stage of a viral infection cycle is likely to drive pro-apoptotic signaling. First, some viruses can trigger an extrinsic pathway, just upon attachment and entry. In the cases reported in the literature (e.g., for the bovine herpesvirus (BHV)), functional proximity between the viral cell surface binding site and death receptors seems to be involved [23]. Second, intrinsic pro-apoptotic signaling in infected cells is the logical consequence of the multiple decompensations caused by viral multiplication on cellular homeostasis. It is argued that to ensure its replication cycle and the production of its progeny, the virus robs the cell of its resources for its own benefit. This hijacking of cellular metabolism, the diversion of protein synthesis, and nucleotide pools have been described as being able to disrupt mitochondrial homeostasis and activate the intrinsic pathway of apoptosis [24–26].

In addition to metabolic reprogramming, the increasing amounts of viral compounds following virus replication are likely to generate stresses that lead to apoptosis initiation. The considerable input of proteins to be processed by the endoplasmic reticulum leads to ER stress and UPR. This adaptive response is implemented by cells for its antiviral effects

at the end. UPR is a way to reduce viral protein synthesis and ultimately results in the self-destruction of the cell, thus bypassing the virus. Many viruses have replication cycles that lead to UPR-dependent apoptosis. This kind of viral induced cellular stress, followed by cell death has been extensively documented, for example, in Japanese encephalitis virus (JEV) and herpes simplex virus (HSV) infections [27–29]. Viral compounds have been identified as capable of inducing apoptosis on their own. Among the flaviviruses, the overexpression of viral proteins, both of structural and non-structural origin, or of peptides derived from these proteins such as the peptide called apoptoM has demonstrated their cytotoxic capacity [30–33]. Unfortunately, the exact mechanisms of their pro-apoptotic action remain poorly understood. One assumption is that some of them may be more specifically responsible for the UPR response by initiating the formation of misfolded aggregates in the ER lumen.

The literature on virus-induced apoptosis frequently reports that viruses can change the dominant relationship between pro- and anti-apoptotic factors. It has been shown that Dengue virus (DENV2) induces apoptosis via the expression of XIAP associated factor 1 (XAF1), an inhibitor of the anti-caspase activity of the XIAP protein [34]. Additionally, several viruses are known to upregulate the expression of pro-apoptotic factors. West Nile virus (WNV), for example, induces apoptosis via increased transcription of the pro-apoptotic factor BAX [35] (Figure 1).

Furthermore, it is increasingly suggested that pattern recognition receptor (PRR) activation by viral compounds, in particular viral genomes in all their forms (DNA, cDNA, single-, and double-stranded RNA) and the subsequent innate immunity signaling, can result in apoptosis [36]. The mitochondrial antiviral-signaling protein (MAVS) recruitment by RIG-I and MDA5 sensing can disrupt the mitochondrial membrane potential and lead to caspase activation [37]. IRF3, an interferon response factor, can directly promote BAX oligomerization at the outer mitochondrial membrane or act as a transcription factor able to upregulate the expression of BH3-only NOXA [38,39]. Of note, activation of PRRs, in addition to promoting the immune response with inflammatory cytokine production, seems to lead to various forms of cell death such as pyroptosis and necroptosis [40]. This diversity of signaling pathways in response to viral infections has led to the emergence of a PANoptosis concept, based on the crosstalk between key molecules of each type of PCD [41].

3. Zika Infection

3.1. Zika Virus, Historical Data

Zika virus (ZIKV) is a pathogenic arbovirus, vectorized by mosquitoes of the genus *Aedes* (*Ae.*) [42]. It belongs to the *Flaviviridae* family and the *Flavivirus* genus such as DENV, WNV, and many others. It was initially isolated in 1947 from a sentinel rhesus monkey during a study on the circulation of the Yellow Fever virus (YFV) in Uganda and found later in *Ae. Africanus* mosquitoes [43]. The first human case was described in 1952 [44], but little research on ZIKA arbovirology has been conducted over the past century as only a few outbreaks and sporadic cases have been reported, with only mild characteristics evoked for the symptoms. This has changed over the last twenty years with the re-emergence of ZIKV, associated with major epidemics and severe forms of ZIKA diseases. ZIKV returned to the spotlight in 2007 in Micronesia [45], then the virus reached French Polynesia in 2013 [46], and affected Brazil in 2015, where an estimated 1.5M people were infected [47]. This epidemic emergence led the World Health Organization (WHO) to declare ZIKA disease as a public health emergency in February 2016. Analysis of circulating viruses revealed the existence of two lineages, an African lineage and an Asian-American lineage containing all the strains that have led to the epidemic outbreaks [48]. Today, the virus circulates endemically in several regions and outbreaks are occasionally observed such as in Jaipur in India [49]. Further emergences could lead to sporadic outbreaks in certain places described as being at high risk of introduction [50,51].

3.2. Zika Virus Transmission and Clinical Outcomes

Associated with the virus's emergence, new modes of transmission have been discovered. Several hypotheses have been put forward to explain the extent and rapid expansions of the last outbreaks. Among them was the switch from historical African and sylvatic species of mosquitoes to more urban vectors, mainly *Ae. Aegypti*, but also *Ae. Albopictus*, *Ae. Polynesiensis*, *Ae. Vittatus*, *Ae. Unilineatus*, and *Ae. Hensilli* [52]. More unusual among flaviviruses, non-vector modes of transmission have been reported for ZIKV such as sexual transmission. This has led the Centers for Disease Control (CDC) and the WHO to recommend the use of condoms or avoidance of sex for at three months [53,54]. Maternal–fetal vertical transmissions were also reported during pregnancy [55].

Clinical forms are in most cases common to many arbovirosis and include fever, rash, arthralgia, and sometimes conjunctivitis due to direct eye infection [56]. The febrile state usually resolves in less than a week [45].

However, serious complications have occurred after infection with ZIKV. The most outstanding ones have been neurodevelopmental injuries during mother-to-fetus transmission, but peripheral nervous system disorders such as Guillain-Barré syndrome in adults have also alerted the international scientific community. High levels of anti-ganglioside antibodies in affected patients with this syndrome may be linked to this pathology [57,58].

Numerous cases of congenital Zika syndrome (CZS) including microcephaly due to arrested development of the cerebral cortex [59], brain calcifications, intrauterine growth restriction, and fetal death were reported during the 2013 Polynesian and 2015 Brazilian epidemics and among imported cases all over the world [9,59]. The case fatality rate for microcephalic infants is estimated to be around 10%, with the worst outcomes seen in late preterm and/or low birth weight newborns [60,61].

Another surprising feature of Zika infection was the discovery that viral RNA could be found until 40 days in serum and until 120 days in semen after the onset of symptoms [62,63]. Moreover, a recent report suggests that viremia could be found three years after infection, probably due to genetic susceptibility [64]. All these data suggest that ZIKV can persist in the host body after the acute phase of the viral infection.

3.3. Zika Virus Structure and Life Cycle

The ZIKV genome is composed of a positive 11 kb single-stranded RNA that encodes 10 proteins. Among these proteins, three are structural (C, prM, E) and seven are non-structural (NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B, NS5) as shown in Figure 2A and reviewed by Petersen et al. [65]. In classical vector transmission, an infected mosquito will deliver the virus to the epidermis of the host during its blood meal. ZIKV will further enter its target cells and move along the endocytic pathway to reach the endosome. Fusion of the viral envelope and decapsidation will release the viral genome into the cytoplasm where it will be directly translated into a polyprotein further cleaved by viral proteases (NS2B/NS3) and host proteases of the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi apparatus. The envelope protein (E) is involved in virus entry and receptor recognition. The membrane (prM) protein present in the immature virion prevents premature fusion during egress; it is further cleaved in M protein. The nucleocapsid protein (C) holds the viral RNA. The non-structural proteins participate mainly in viral replication. The NS5 protein implements genome replication platforms at the ER membrane, with cofactor proteins such as NS1, NS4A, and NS4B. NS1 is a singular flaviviral protein that can be secreted and found circulating in the bloodstream. Its role in Zika disease is not clearly identified, but it is known to be highly immunogenic and potentially involved in metabolic modifications [66]. After incorporation of neo-synthesized viral genomes in capsids, and budding from the ER membrane, virions move to the Golgi apparatus where the host furins lead to a mature virion. The non-coding regions of the viral RNA (3'UTR), which leads to the production of small flavivirus RNA (sfRNA) that accumulate in infected cells, are known to be important in modulating cell responses [67].

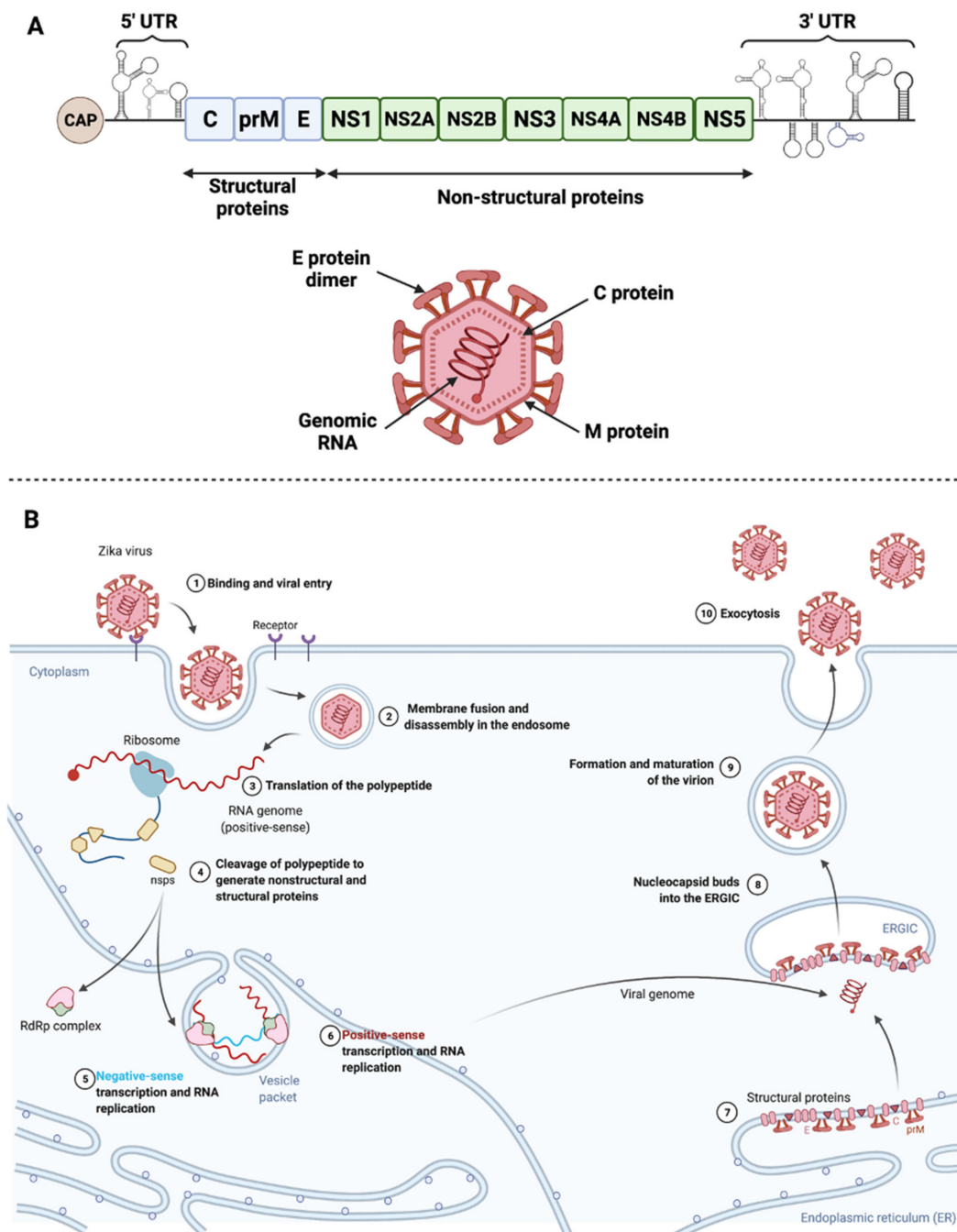


Figure 2. Zika virus structure and life cycle. (A) Scheme of Zika virus genome and structure. Zika virus genome encodes 10 viral proteins, three structural, and seven non-structural. 5' and 3' UTR refer to untranslated regions [65]. (B) ZIKV binds its specific receptors and is subsequently internalized into the target cell via clathrin-mediated endocytosis (1). Viral RNA is released into the cytoplasm following virus fusion with the endosomal membrane and capsid disassembly (2). Upon release, positive-sense RNA is translated into a polypeptide incorporated in the endoplasmic reticulum (ER) membrane and cleaved by proteases into structural and non-structural proteins (3,4). It will also be transcribed into negative-sense RNA that will serve as a template for RNA replication that takes place in ER vesicle packets (5,6). Viral proteins are accumulated and structured at the level of the ER (7). Virus assembly, budding, and maturation then occur in the ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC) and in the Golgi apparatus, respectively (8,9). New viruses are released by exocytosis (10). Adapted from Lebeau et al. [66].

3.4. Zika Virus Tropism and Pathogenesis

Although not classified as an encephalitic flavivirus, ZIKV has been responsible for debilitating CNS disorders in neonates in the severe forms of infection described from 2013 in Polynesia and 2015 mainly in Brazil [68]. Most of the documented CZS mention hypoplasia of the cerebellum, delayed myelination, calcifications, and many cortical abnormalities [69]. ZIKV infection during the first or second trimesters of pregnancy also resulted in hearing loss and blindness in newborns [70]. In-vitro, ex-vivo, and in-vivo study models have been developed to understand the pathological processes behind these clinical outcomes.

Multiple strains of ZIKV of African or Asian-American origin have been isolated and used for the study of ZIKV tropism and pathogenesis. Some studies have used recent epidemic clinical isolates and other infectious clones for the analysis of (i) viral tropism and (ii) molecular determinants of pathogenesis [71]. Some teams [72,73] have reported in their reviews that ZIKV infection in mouse models (neonatal wild-type mice, adult immunocompromised *Ifnar1*^{-/-} mice) had reproduced the main features of the human disease including infection of the placenta and neuro-invasiveness, leading to reduced brain development and fetus size. Many studies have shown that in these models, the virus could accumulate in various organs such as the brain with associated damages, in the spinal cord, in eye associated tissues, male and female reproductive tracts, gonads, and kidneys. Neurotropic pathogenesis has been attributed to the depletion of neural progenitor cells; however, their infection does not appear to be the only cause of their loss [74–76]. In non-human primate models, infection also resulted in fetal brain lesions and ZIKV RNA was found in saliva and seminal fluids for at least three weeks after the end of viremia [76].

In the field of in-vitro models to investigate the interaction of the virus with its human host, Marazzo and colleagues recently reviewed how the development of neurosphere organoid cultures has provided insights into the specific neuropathological mechanisms of ZIKV [77]. The different studies that have been carried out using these models have confirmed that neuronal and neural progenitor cells were susceptible to ZIKV [78].

Finally, ZIKV was shown able, in-vitro and in-vivo, to infect trophoblasts, fetal endothelial cells of the placenta, placental macrophages (Hofbauer cells), and perivascular cells [79,80]. It has also been shown to infect a variety of cultured cells and cell lines of both fibroblast and epithelial origin [81].

4. Zika Virus and Apoptosis

As the cytopathic activity of the virus may explain the pathogenic processes and some clinical outcomes, many studies have evaluated the viral-induced forms of PCD in in-cellulo, ex-vivo, in-vivo, and in animal models of ZIKV infection. The onset timing of cytopathic effects and the search for markers specifying the virally mediated cell death were conducted and compared to the course of infection and completion of the viral cycle. Various apoptosis data obtained for different ZIKV strains and infection models have been compiled in Table 1. Hence, the main protagonists of apoptosis that are under the control of ZIKV are highlighted in Figure 3.

Table 1. Apoptotic induction in different biological models infected by ZIKV.

Virus Strain	Cellular Model	Apoptotic Cues	Apoptosis and ZIKV Infection Interplay	Reference
MR766: East African strain isolated from sentinel rhesus in Uganda in 1947 (Dick, Kitchen, and Haddow 1952)	HT1080 (Human epithelial cells derived from fibrosarcoma)	Apoptotic cell death markers were cleavage of Caspase 3 and PARP.	Apoptosis was shown to be delayed by inhibition of the JAK-STAT pathway by ZIKV NS2B/3 proteins.	[82]
Brazil 2015 (KU940228) Brazilian strain 2015 (Calvet et al., 2016)	hNPCs (Human Neural Progenitor cells)	Early apoptosis was induced at 24 h.p.i. with caspase 8, 9, and 3 activation. This viral strain was found to be highly deleterious to human neural progenitor cells.	Apoptosis was shown to limit viral production. This was reversed by the use of Z-VAD which induced an increase in intracellular viral RNA.	[83]
MR766	hNPCs	Apoptotic cell death was induced at 72 h.p.i. Caspase 3 expression was highly increased 3 d.p.i.	N.D.	[84]
cDNA encoding the E, prM-E and M-E proteins of the Haitian ZIKV strain (KU509998.3) isolated in 2014 (Lednicky et al., 2016)	PC12 cells (Rat pheochromocytoma cells)	Intrinsic mitochondrial pathway.	Envelope viral protein induces apoptosis by increasing BAX expression and decreasing Bcl-2 expression at the transcriptional and translational levels at 48 h.p.t.	[85]
H/PF/2013: French Polynesian 2013 clinical isolate (Cao-Lormeau et al., 2014)	A549 (Human Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cell)	ZIKV induces mitochondrial apoptosis 48 h.p.i. by activating caspase 9 and 3.	Apoptosis is detected when the viral progeny reaches the peak.	[81]
MR766	HuH7 (Human hepatoma cell lines) and BCLX ^{KO} HuH7 cells	MCL1 expression decreases in cells infected with ZIKV while BCLXL expression is not affected. BCLXL down-regulation induces cell apoptosis.	Decreased MCL1 expression during ZIKV infection promotes viral replication in vitro.	[86]
H/PF/2013 MR766 and Brazil 2015 BeH819015 (molecular clones)	A549, U251MG (derived from a human malignant glioblastoma), HEK293 (Human embryonic kidney 293 cells)	ZIKV infection leads to mitochondrial apoptosis when most of the ZIKV progeny is released by the infected cells. (48 h.p.i),	ZIKV delays apoptosis in infected cells and confers protection against exogenous apoptosis induced by either intrinsic or extrinsic pathways.	[87]
PLCal ZV: Asian strain isolated in 2013 in Thailand (Ellison et al., 2016) PRVABC-59: Asian strain isolated in Puerto Rico in 2015 (Lanciotti et al., 2016)	HFAs (Human fetal astrocytes), A549	Late apoptosis was induced in ZIKV HFA infected cells. Under 50% of the infected HFAs exhibited apoptosis compared to more than 90% for A549 5 d.p.i. This indicates that HFAs are remarkably resistant to apoptosis induced by ZIKV.	Although HFAs have a strong antiviral response, it has been shown that they keep excreting ZIKV for up to 28 d.p.i.	[88]

Table 1. Cont.

Virus Strain	Cellular Model	Apoptotic Cues	Apoptosis and ZIKV Infection Interplay	Reference
MR766 (molecular clone) PRVABC-59	Primary human Sertoli cells	Less than 10% of Sertoli PRVABC59 infected cells are apoptotic versus around 70% of A549 infected cells at 72 h.p.i. These percentages are half as low when cells are infected with the MR766 strain. The low level of ZIKV-induced apoptosis detected in Sertoli cells explains the persistence of both American and African ZIKV strains in these cells.	The limited percentage of apoptosis observed in ZIKV-infected Sertoli cells allows the virus to replicate furthermore. The peak of viremia was detected between 3 and 4 d.p.i.	[89]
r-MRV (recombinant MR766 strain) PRVABC-59	HTR-8 cells (Human immortalized first-trimester placental trophoblast cells), JEG-3 and JAR (choriocarcinoma-derived third-trimester placental trophoblast cell lines)	Apoptosis was induced in all three cell lines at 48 h.p.i. CHOP upregulation and nuclear translocation were observed 24 h.p.i. Trophoblast induced-apoptosis involved activation of caspases, ER-Stress markers and most importantly JNK protein.	Apoptosis was strongly inhibited by the use of JNK inhibitors.	[90]
MR766, SZ01 (Asian strain, isolated in China in 2016)	hRPTEpiCs human renal proximal tubular epithelial cells	MR766 induced a higher degree of cell apoptosis (48 h.p.i.) compared to SZ01 (9 d.p.i.)	ZIKV persisted for more than 30 d.p.i within the hRPTEpiCs.	[91]

h.p.i.: hours post-infection. d.p.i.: days post-infection h.p.t.: hours post-transduction N.D.: not determined.

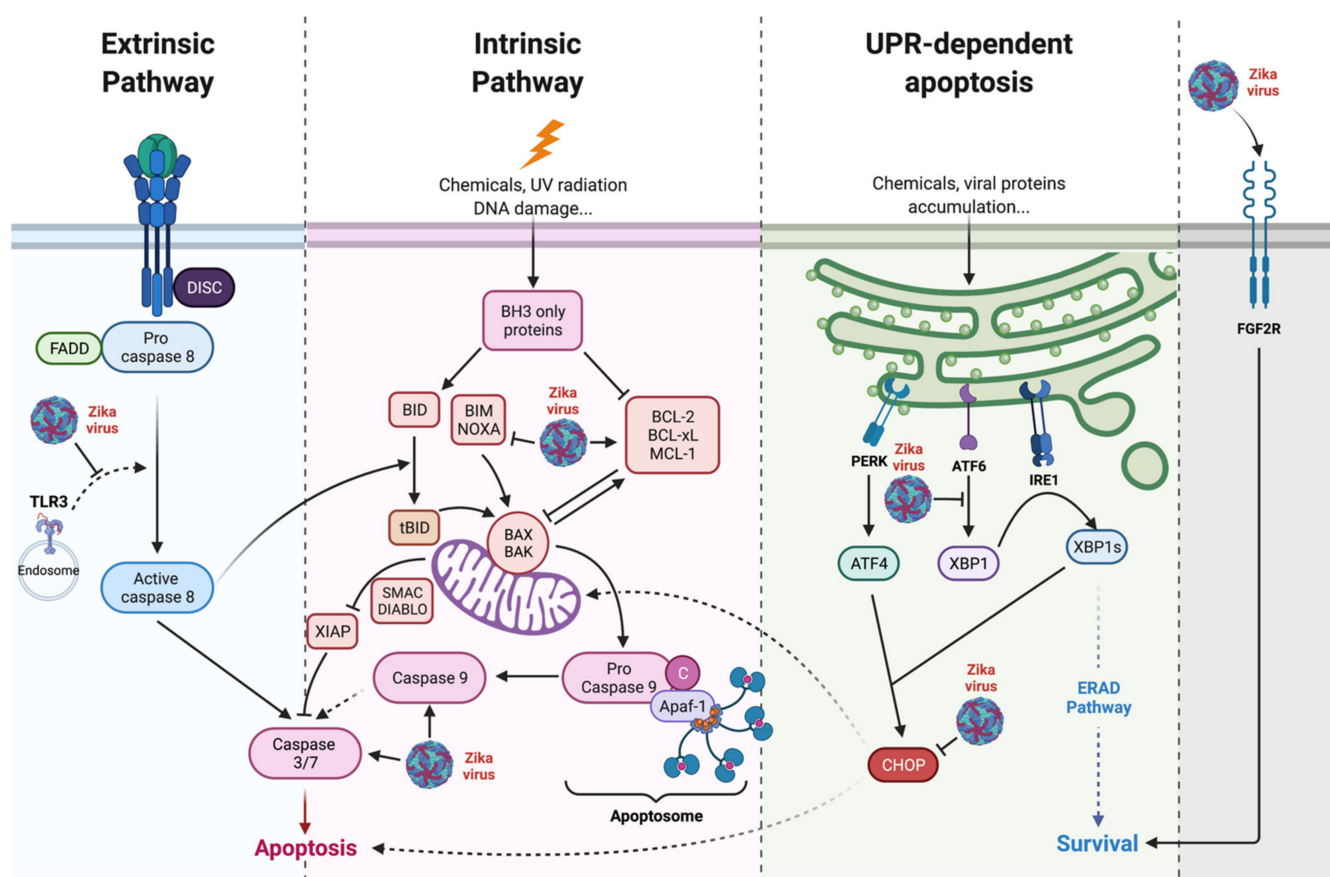


Figure 3. Zika virus controls apoptosis. ZIKV acts on anti-apoptotic factors such as Bcl-2 or Bcl-xL mainly through an effect mediated by the non-structural proteins. ZIKV controls CHOP activity during UPR, limiting its pro-apoptotic activity [92]. DsRNA/TLR3 induced apoptosis is controlled by ZIKV through NS2B/3 [82]. ZIKV also stimulates the expression of pro survival factors such as fibroblast growth factor 2 (FGF2) [88,93].

4.1. Is Early Apoptosis in Development Responsible for the Irreversible Damage Produced by ZIKV Infection?

Most of the studies carried out suggest that ZIKV elicits apoptosis *in vitro*, around 48- or 72-h post-infection in cultured cell models. We and others have thus evidenced the mitochondrial events typical of PCD by apoptosis and the implication of BAX and caspases in fibroblast HT1080, in epithelial cell lines such as A549, HEK 293 [81,94], in glioblastoma astrocytoma U-251 MG [95], and in neuroblastoma cell line SH-SY5 [96] and neural crest cells PC-12 [85].

Cells that may be key players in the unique pathogenic process of ZIKV, which depends on maternal–fetal transmission, blood–brain barrier crossing, or important points in the neurodevelopment, were specifically studied.

One of the main issues raised by the CZS observed during the last outbreaks was how ZIKV spread into the fetal compartment early in gestation and whether apoptosis could be involved in the process. The mechanisms of crossing the uterine–placental interface (UPI) by ZIKV have been extensively studied and reviewed. Many cell types of the UPI support ZIKV replication. Placental infection, associated cytopathic effects and injury were characterized *ex vivo*, in villus explants from the first-trimester of pregnancy, in primary cells isolated from placental tissues, and in several relevant cell-lines [97–100].

Santara et al. found that in the first-trimester placenta, infected trophoblasts under severe ER stress were being destroyed, particularly through direct killing by maternal decidual natural killer cells (dNK) [101]. Thus, Muthuraj et al. showed that human immortalized placental trophoblasts and human choriocarcinoma-derived cell lines responded

to infection by implementing an UPR-dependent apoptosis, with activation of JNK and that this feature could contribute in the dissemination of ZIKV from mother to fetus [90]. As above-mentioned (Section 2.2), virus-induced apoptosis may be the result of ER stress and unresolved UPR. During ZIKV infection, not all PERK, ATF6, and IRE1 pathways of the UPR are activated in the same way in all models [102,103]. It was found that ZIKV was actually able to control these responses during infection, acting *de facto* on the downstream UPR-dependent apoptosis. Thus, the ATF6 pathway appears to be little or not active, depending on the model and potentially inhibited during ZIKV infection [87,104–106]. If it is admitted that the IRE-1 pathway of UPR could activate apoptosis through JNK phosphorylation [107], an important factor in UPR-dependent-apoptosis is the transcription factor CCAAT-enhancer-binding protein (C/EBP) homologous protein (CHOP), whose expression is directly linked to the PERK pathway [108]. However, if we and others have noticed a significant increase in the transcriptional expression of CHOP [104], there is a lack of information concerning the CHOP protein presence in ZIKV infected cells. Thus, in the A549 model, we showed that the CHOP factor and its pro-apoptotic translational program were not induced [92]. Assessment of its role in the virally induced UPR-dependent apoptosis is therefore difficult. Furthermore, the control that the virus may exert over this factor instead suggests that ZIKV deploys strategies to inhibit or delay apoptosis.

To complete the available data on the mechanisms of maternal–fetal transmission, it is also worth mentioning that a pro-inflammatory context, likely to alter the physical placental barrier function, a cell-to-cell infection process, and a Trojan horse role for infected Hofbauer cells would be the major causes of viral dissemination through the placenta and then to the fetus. It is therefore interesting to note that primary Hofbauer cells have been shown to be resistant to virus-induced cell death [109]. Furthermore, in contrast to the African strains, the Asian-American epidemic strains showed more frequent replication in Hofbauer cells, increased dissemination, and longer viremia, but with lower viral titers. It was then proposed that the African strains, which were found to be more cytotoxic, might induce a better immune response and less accessibility to crossing the maternal–fetal barrier [110]. The timing or extent of apoptosis in placental tissue could be an example of the dual action of ZIKV on cell death to improve its dissemination strategy.

To gain an insight into the pathophysiology of ZIKV in neurodevelopment, infections have been conducted in neuronal models. Apoptosis was then shown to be induced in human neural progenitors (hNPC) and associated with P53 and cell cycle impairments [111]. In addition, *in vitro* models of hNPC derived from induced pluripotent stem cells (iPSC) were found to be susceptible to infection with mitosis abnormalities and cytopathic effects marked by caspase-3 activation [83].

Among the studies conducted *ex vivo*, sliced human fetal brain tissues from 14 to 21 weeks of gestation were infected with ZIKV. Activated caspase 3 and DNA fragmentation could be found in numerous infected and non-infected cells. Targeted cells were intermediate progenitor cells (IPCs) and post-mitotic neurons, confirming that ZIKV-induced neuropathogenesis could be the consequence of the disappearance of these cell populations [112].

Several *in vivo* study models support this assertion. In a mouse model of intracranial infection at different stages of embryonic development, co-immunoreactivity throughout the brain of cleaved caspase-3 and ZIKV are indicators of deleterious cell death [8]. In a recent study, oligodendrocyte loss in spinal cord and white matter has been linked to neurodevelopmental defects and perinatal ZIKV induced pathogenesis in mice [113]. In another chick embryo model, virus-induced apoptosis of cranial neural crest cells was shown to be responsible for aberrations in cranial osteogenesis and to lead to birth defects [114]. Finally, studies in pregnant non-human primate infection models revealed that neuroprogenitor apoptosis followed placental and fetal vascular compromise [115].

It should be noted that the study of ZIKV-induced patho-neuro-physiology has greatly benefited from the development of complex neurosphere and brain organoid models. Organoids are 3D cell cultures of self-organized progenitor cells that mimic the tissue

architecture and development [116]. Several studies on these models have shown a size reduction in ZIKV infected neurospheres and brain organoids and a depletion in neural progenitors [75,78,110].

Transcriptome analyses performed on infected hNPCs, SH-SY5Y neuroblastoma cells or brain organoids revealed that ZIKV modified the expression of several factors related to apoptosis, neuronal development, and differentiation [75,84,96,117,118]. ZIKV infection resulted in increased expression of BAX, BID, and APAF1 in SH-SY5Y [96,117]. Caspase-3 gene was overexpressed in hNPCs [84] such as BAX, Bcl-2, and genes involved in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) signaling and TRAIL-mediated apoptosis such as death receptors DR4 and DR5 [119]. ZIKV infection could increase cell susceptibility to extrinsic death, suggesting that a bystander cytotoxic effect in developing brain tissue should not be minimized. Among the molecular mechanisms that could lead to cell death, it has been shown that ZIKV was able to induce p53 activation and to inhibit the mTOR pathway with an early switch from glycolysis to oxidative phosphorylation [120]. The changes in cellular metabolism initiated by the virus at a vulnerable period of neuronal development would then be responsible for the defects in differentiation of immature neural stem cells and their exhaustion. Another study showed that an epidemic strain of ZIKV provoked cell cycle arrest in neural stem cells by activating the p53-p21 signaling pathway [121]. This suggests that in addition to cell death, ZIKV-induced neuropathogenesis could also be due to proliferation and differentiation failures.

As a first look at all the data linking cell death and post-infection pathophysiology, it seems that a consensus has emerged on the capacity of ZIKV to induce an excess of apoptosis too soon during the particular situation of gestation and fetal development. This cell death would occur at the level of placental cells, which would facilitate the dissemination of the virus to the fetus. Apoptosis would then concern the neuronal progenitors and astrocytes. It would be responsible for a depletion of neuronal populations and for definitive damage during the development of the fetal brain.

4.2. Is Delayed and Impaired Apoptosis Responsible for ZIKV Persistence and Unusual Transmission Pathways?

A delayed apoptosis controlled by ZIKV was supported by mathematical models [122] and experimental approaches. By comparing studies describing the onset of in vitro virus-induced apoptosis in different cell models (Table 1), it appears that ZIKV triggers a delay of this cellular response and that this delay is to its own benefits. In in vitro infection models of epithelial cells, the first cytopathic effects occur after the completion of the viral cycle and the release of the viral progeny [81,87]. This timing is very different from that produced by infection with other arboviruses of the alphavirus family such as Chikungunya virus (CHIKV) or Ross River virus (RRV) [87,123]. At equivalent multiplicities of infection in the same cell types, the latter induced apoptosis as early as 6h post-infection, whereas with ZIKV, the first signs of PCD were only visible 48 h post-infection. In their studies, Limonta and colleagues argued that astrocytes were infected by ZIKV with reduced cytopathic effects including apoptosis, probably through FGF-2 upregulation during infection [88,93]. Therefore, they hypothesized that a ZIKV-driven anti-apoptotic activity was correlated with long-term infection and with the persistence of replicating virus in astrocytes.

A body of evidence points to the ability of ZIKV to manipulate cell death in order to limit the antiviral action produced by the cell auto-destruction. Thus, several studies have shown that apoptosis has an antiviral effect on ZIKV. Addition of the pan-caspase inhibitor, zVAD-FMK during infection leads to an intracellular increase in viral RNA [83]. The use of inhibitors of the anti-apoptotic Bcl-2 family proteins, triggered an earlier apoptosis in infected cells by ZIKV [86]. In the same publication, Suzuki and colleagues reported that HuH7 cells that were knocked out for the anti-apoptotic gene BclXL underwent an accelerated apoptosis with a suppressed viral dissemination. This was observed with ZIKV and other flaviviruses such as DENV and JEV. BclXL gene suppression led to a reduction in the viral loads in cells and animal models. Last but not least, this apoptosis remediation also

increased animal survival in JEV infected mouse models. Suzuki and co-authors concluded from their study that delayed apoptosis was associated with high viral pathogenicity, whereas early apoptosis combined with accelerated efferocytosis inhibited viral spread in the body and limited pathogenicity.

In the case of ZIKV infection and its unique pathogenesis with neurological complications, the role of anti-apoptotic factors and the control of their expression or activity by the virus have been examined. A clinical study of cases of fatal microcephaly found that the parenchyma of infected newborns had a two-fold increase in the anti-apoptotic Bcl-2 protein. This feature appears to be specific to CZS as microcephalies of other origin do not have variation in Bcl-2 expression [124]. Based on the observation that ZIKV seemed to be able to counteract apoptosis, our team had the idea of testing the protection that the virus could offer to cells against an exogenously induced apoptosis. Surprisingly, cell death hallmarks could not be observed in A549 cells when apoptosis was artificially induced two hours after infection with ZIKV. Inhibition of cell death in the presence of ZIKV was achieved whether the induction of apoptosis was extrinsic, with TNF-alpha, or intrinsic, with etoposide or blasticidin. This protection from exogenous apoptosis was potentially dependent on the presence of ZIKV non-structural proteins [87]. In addition, another study indicates that double-stranded RNA (Poly I:C) induced apoptosis is reduced by overexpressing the ZIKV NS2B/3 non-structural proteins [82].

We investigated which protagonists of apoptosis ZIKV was able to act upon and also observed that the amount of anti-apoptotic protein Bcl-2 was increased during in vitro infection. A privileged role for the Bcl-2-family of anti-apoptotics was confirmed by the use of the inhibitor ABT-737, which abrogated ZIKV-mediated protection, led to restoration of apoptosis, and reduced viral infection [87]. As previously mentioned, we also found that ZIKV was able to subvert the CHOP pro-apoptotic program and thus override ER-dependent apoptosis [92].

This viral ability to inhibit one of the main cellular defense responses to infection legitimately raises the question of its effect on the outcome of infection and, if unsuccessful, the possibility that the virus will not be properly eliminated. There is an extensive literature on the strategies developed by infectious agents to manipulate apoptosis and the link between impaired apoptosis, deficiencies in viral clearance, and viral persistence in privileged niches [125–128]. Numerous studies on the mechanisms and issues of ZIKV infection have revealed that the virus can indeed persist for a long time after the primary infection.

Initially puzzling to the scientific community, a first case of sexual transmission of ZIKV was reported in 2011 [129]. The confirmation that this route of transmission was far from anecdotal, and observed with both Asian and African strains of ZIKV raised the possibility that ZIKA could persist in the male reproductive organs [10]. Indeed, viral RNA have been detected in semen for up to six months post infection, suggesting that men may therefore act as potential reservoirs of ZIKV [130]. Reproductive tract and testis certainly offer a suitable immune-privileged environment for ZIKV persistence.

High-level and persistent viruria could also be observed for up to 15 days after the onset of infection symptoms. Several cell types of the infected renal tissue such as glomerular cells or renal proximal tubular epithelial cells (hRPTEpiCs) may be susceptible as reservoirs for long-term excretion of ZIKV in urine [91,131].

The maintenance of viral replication in these different cells, whether or not associated with their survival and incomplete apoptosis, deserves further investigation.

Then, the first clinical indications that the virus might also persist in the CNS were given when worrying cases of neurological complications were reported in infants a long time after their birth and their in-utero exposure to ZIKV [132,133].

In conclusion, a body of evidence indicates that ZIKV manipulates apoptosis, which is an adverse response of the cell to virus multiplication. This ability could account for the persistence of the virus in immunoprivileged niches. Inhibited or delayed apoptosis and viral persistence could influence pathogenesis and could explain the unique features of

ZIKV infection. These main singularities are the non-vectorial routes of transmission and the ability to induce neuropathogenesis long after infection.

4.3. Apoptosis in the Mosquito Vectors

In mosquito cells, arbovirus infections rarely cause cytopathic effects, and the limited data currently available assessing the role of apoptosis in vector competence suggests that apoptosis is detrimental to the virus. Virus/vector interactions appear to have co-evolved by limiting apoptosis, probably to an initial regulation by non-retroviral integration RNA virus sequences (NIRVS) and the piRNA antiviral pathway [134]. In invertebrate cells infected with Zika virus, very few, if any, cytopathic effects are observed [135]. Furthermore, it seems that sfRNA from ZIKV could inhibit apoptosis whereas sfRNA mutants showed increased TUNEL positive cells in-vivo. Adding caspase inhibitors rescued a 'wild type' virus transmission rate in a sfRNA mutant, showing that apoptosis decreases the transmission rate in mosquitoes [136]. This confirms previous studies on arboviruses and apoptosis in mosquitoes [137].

Infection with ZIKV leads, in particular, to a reprogramming of cellular glucose metabolism in a human cell model by enhancing ATP production via the use of the tricarboxylic acid cycle [26]. In contrast, during infection of mosquitoes' cells, ZIKV increased the use of glucose through the pentose phosphate pathway. Thus, this differential reprogramming of glucose metabolism changes the cellular ratio of AMP/ATP, which leads to the differential status of the AMPK phosphorylation level between mosquitoes and humans during ZIKV infection. The AMPK activation in human cells contributes to caspase-mediated cell death, and conversely, low activation of AMPK in mosquitoes' cells prevents apoptosis [26].

All of these different apoptosis control mechanisms are important for vector competence, and thus virus spread between mosquitoes and humans.

5. Therapeutics Related to ZIKV, A Role for Apoptosis?

In addition to preventive measures, which mainly involve personal protection against mosquito bites, it is essential to respond to the Zika threat by developing treatments and vaccines. Currently, we have neither one nor the other, although a vaccine candidate using mRNA technology has recently shown promising results in mice [138]. The development of anti-ZIKV drugs must take into consideration several specificities such as the passage of the virus in immune-privileged sites (central nervous system, placenta, gonads) and it must be adapted for the particularly fragile target of pregnant women or women planning a pregnancy.

One approach to containing the infection is to fight the virus early by acting on the virus particle itself or at a particular stage of the viral cycle (entry, replication). Unfortunately, although many studies have been carried out and have proposed molecules with promising effects in vitro, no validated treatment has yet been improved [139–141].

Alternative strategies focus on enhancing the natural antiviral responses of host cells by repurposing already known active therapeutic molecules. Trials using the proteasome inhibitor bortezomib have demonstrated antiviral activity in in vivo models and have provided some hope [142,143]. The advantage of targeting host responses is to limit the risk of the emergence of treatment-resistant viral variants, as has been observed with nucleotide analogues [144,145].

5.1. Antiviral Treatment through Apoptosis Remediation

Based on the observation that many viruses, and this is the case of ZIKV, manipulate the cell death response and that this capacity contributes to infectious processes (outcome, pathogenesis, viral persistence), therapeutic options using apoptosis remedial action have been explored. The underlying idea is that restoring apoptosis can improve or accelerate the resolution of infection and free the body from potential virus persistence [146]. Apoptosis sensitizers such as inhibitors of the Bcl-2 family or molecules mimicking suppressors

of apoptosis inhibitors (synthetic SMAC/DIABLO proteins) have thus been tested as antiviral candidates [147]. From this theory of a ‘functional reactivation of apoptosis’ during infection, an antiviral strategy caused a sensation in 2011. By combining the double-stranded RNA recognition domain of the PKR protein and the caspase interaction domain (CARD) of the Apaf1 protein, the technology called double-stranded RNA (dsRNA) activated caspase oligomerizer (DRACO) showed broad-spectrum antiviral activity and lack of toxicity in murine, human, and in vivo non-human primate cells [148]. It resulted in an 80% reduction in mortality in a mouse model of H1N1 A/PR/8/34 infection. Following the same idea, the antiviral therapeutic potential of molecules known to act by reactivating apoptosis in cancer pathologies was tested on ZIKV infection, with the project of a possible drug repositioning. One study successfully evaluated the anti-ZIKV activity of the anti-cancer obatoclax or GX15-070, a pan-blocker of the Bcl-2 family of proteins [149]. It should be noted that the use of inhibitors of Bcl-2 family proteins had previously been validated for their capacity to inhibit several viruses other than ZIKV, in in vitro and in vivo studies [147].

5.2. ZIKV as Oncolytic Virotherapy

Interestingly, ZIKV has been considered as an oncolytic candidate, notably for therapy of brain cancer [150]. The modes of action of ZIKV on the tumor and the advantages and disadvantages of using this virus, which may be genetically modified, are summarized in Figure 4. Briefly, oncolytic viruses are replicative viruses capable of specific replication in cancer cells. These biological agents have cancer therapeutics potential due to their ability to induce selective tumor cell death through direct cytopathic effects. They induce an immunogenic cell death similar to apoptosis, which releases cell debris and viral antigens. Dendritic cells from the microenvironment will then allow the immune system to be educated against the tumor [151,152]. Countering the frequent immune escape phenomena induced by the tumor microenvironment is therefore one of the major goals of new anti-cancer therapies. Showing the important potential of this type of treatment, the FDA already approved the use of Talimogene Laherparepvec (T-VEC), a modified herpes simplex virus type I, for metastatic melanoma management [151].

As aforementioned, ZIKV has a privileged tropism for neuronal cells in which it produces cytopathic effects [83,111]. This specificity is due to the high level of neuronal expression of the main known ZIKV membrane receptors such as AXL or CD24. Interestingly, these receptors are overexpressed in cancer cells. Due to this ability, ZIKV has been proposed as a promoter of tumor mass reduction for some brain cancers (e.g., glioblastoma multiforme (GBM) and neuroblastoma). Indeed, in 2017, a selective oncolytic activity was shown against glioma stem cells (GSCs) [153], which are therapy-resistant self-renewing tumor precursor cells responsible for the local recurrence of cancer. ZIKV infection in these cells leads to a loss of self-renewal and proliferation due to increased apoptosis, whereas no detrimental effects were observed on normal cells. However, this feature is not a general property of neurotropic flaviviruses, since WNV causes the cell death of GSCs and normal cells. In order to confirm these promising results and show the usefulness of ZIKV as a therapy to treat brain cancer, the authors used a mouse model of glioma. Mice receiving ZIKV injection showed prolonged survival in comparison to mock-infected mice due to extensive tumor cell death.

Consistent with these results, intracerebral injection of a live attenuated Zika virus (ZIKV-LAV) in a mouse model of human GBM significantly reduced intracerebral tumor growth and prolonged animal survival by selectively killing SOX2+ GSCs within the tumor [154]. Recently, the same team reported some details on the mechanism underlying ZIKV oncolytic activity against GSCs [155]. They found out that SOX2 expression in GSCs leads to downregulation of the IFN signaling pathway, this being essential for ZIKV infection and replication in GSCs. Indeed, SOX2 is a core regulator of antiviral response and apoptosis, and is found to be highly expressed in GSCs, which partly explains the preferential lytic effect on GSCs. Moreover, SOX2 has also been associated with the regulation of Integrin α V expression. Integrin α V forms heterodimers, notably with Integrin

$\beta 5$, whose blockade with specific antibodies has led to reduced ZIKV-induced oncolytic effects on GSCs. Thus, the SOX2–Integrin $\alpha V\beta 5$ axis seems to be crucial for oncolytic activity against GSCs, and therefore GBM treatment.

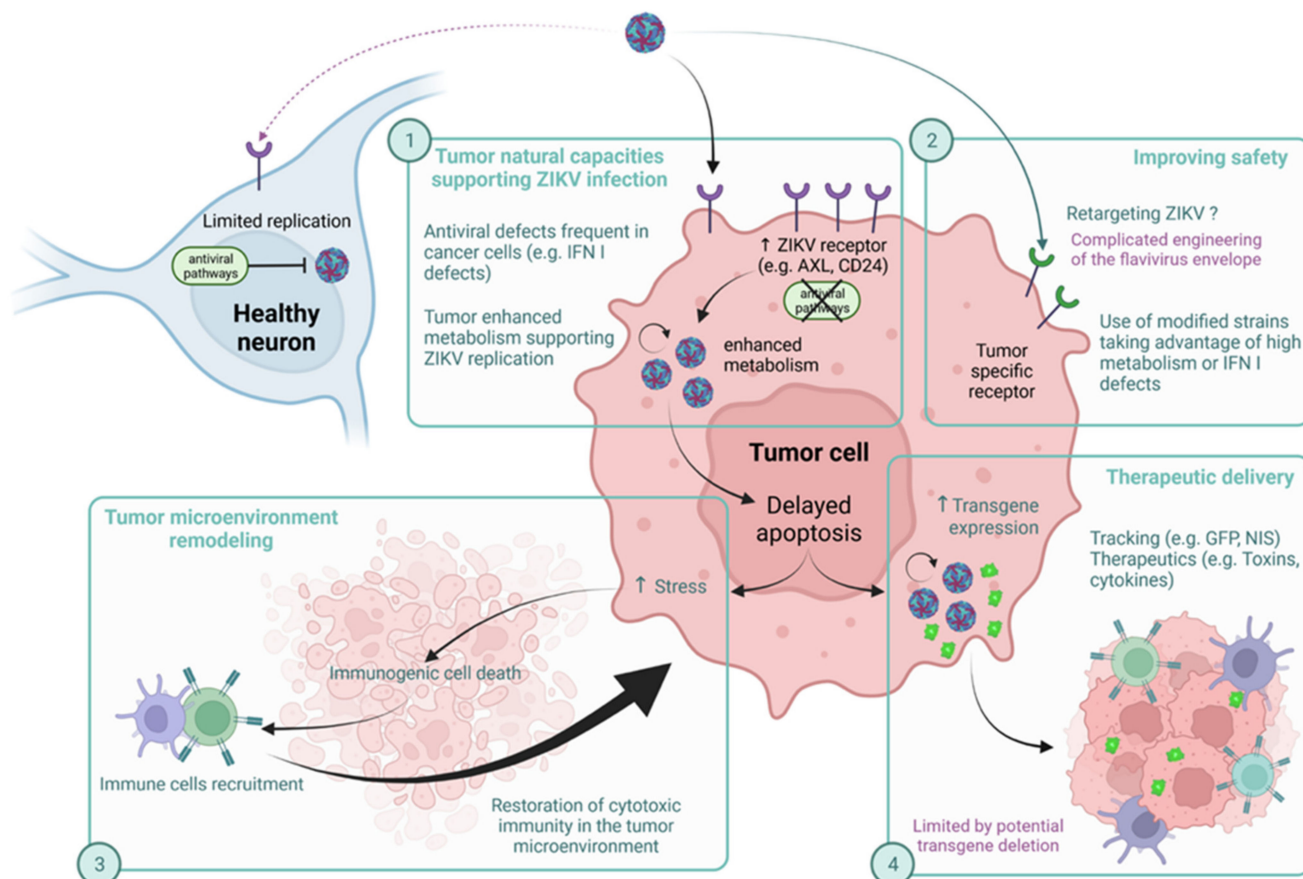


Figure 4. Zika as an oncolytic agent, pros and cons. ZIKV has natural tropism for neurons but its replication is counteracted by antiviral pathways. Tumor cells overexpress receptors for viral entry, have a high metabolism that efficiently supports ZIKV replication, and have frequent defects in antiviral pathways. These natural capacities enhance viral infection (1). To further improve its tropism toward the tumor, ZIKV could be modified to specifically target tumor cell receptors or to be more dependent on the tumor's singular properties (2). Delayed apoptosis induced by ZIKV replication allows for a more immunogenic cell death, which can turn an immunosuppressive tumor microenvironment into an immunoactivating one (3). Delayed apoptosis also promotes transgene expression allowing for more efficient delivery of therapeutics (4).

It has also been shown that ZIKV oncolytic activity requires CD8⁺ T cell recruitment to the tumor microenvironment, as the survival benefits are lost if CD8⁺ T cells are depleted [156]. ZIKV infection enhances immune infiltration, which is favorable for combination with an anti-PD1, an immune checkpoint inhibitor to remove microenvironment induced T-nergy. Moreover, this education of CD8 by ZIKV induced tumor cell death persists over time. Hence, they protect mice against syngeneic tumor rechallenge. Additionally, neuroblastoma cells' permissiveness for Zika virus has been reported [157]. In neuroblastoma cells, ZIKV-induced cytopathic effects lead to a decrease in tumor cell viability. Nevertheless, not all neuroblastoma cell lines were sensitive to ZIKV oncolytic activity. It was shown that CD24 expression, a receptor expressed on the surface of metabolically active cells including cancer cells [158] is essential to ZIKV oncolytic activity [157]. Restoring CD24 (SK-N-AS) expression in a low-permissive neuroblastoma cell line restores ZIKV oncolytic activity, unlike the CD24-deficient cell line. CD24 is rather a brake on

apoptosis, which could promote ZIKV replication in metabolically active cells and consequently induce a better immunogenicity [152,158]. Therefore, ZIKV seems to be a powerful tool for the treatment of brain cancers that are of critical concern. As raised by several teams [151,154,155], the use of ZIKV as oncolytic therapy can only be considered if the safety conditions are met. Data currently available from these studies indicate that viral RNA remained localized to the tumor until two weeks after treatment, showing the absence of viral spread following injection [153].

However, as discussed above, ZIKV can persist in the body and has a broad tissue tropism. There is therefore concern that it may affect several organs other than the target tumor. These issues could be circumvented by improving ZIKV specificity to tumor cells. Indeed, receptors essential for ZIKV entry such as AXL and CD24 that are overexpressed in glioblastoma and neuroblastoma cancer cells, respectively, are also present on many other cell types [158,159]. Thus, addressing ZIKV to a specific receptor on tumor cells would reduce its entry into healthy cells. Technically, modifications can be made to the viral genome to fine-tune its oncolytic capabilities. However, engineering the viral envelope to control the interaction of the viral particle with the cell surface is difficult to design and implement. If retargeting is not possible or not sufficient, another option is to increase the dependence of the virus on the singular properties of the tumor cells. Indeed, it would be possible to make the virus more conditional on the specific enhanced metabolism of the tumor cell, as is the case for the vaccinia virus TK-RR- [160] (or the measles virus vaccinal strain [161]). Genetically-modified ZIKV strains should then be envisaged to further improve the safety of a ZIKV based oncolytic virotherapy [153,154].

Finally, and regarding the ambiguity revealed by our literature review on the ability of ZIKV to promote apoptosis too early or too late, it would appear that delayed or attenuated cell death is not a pitfall, but may be an advantage in oncolytic therapy. Thus, cytolytic effects on infected cells, by being delayed, will promote immunogenicity with a progressive and sustained recruitment of immune cells [156,162]. This mechanism is decisive in overcoming immunosuppression induced by the tumor environment, one of the main strengths of virotherapy. It should also be noted that the possibilities of manipulating oncolytic viruses have led to their proposal as vectors for therapeutic agents such as T-VEC, which encodes for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to increase its immunostimulant properties [163]. In this context, a virus with persistent replication still has an advantage in that it can increase the production of the therapeutic protein over time. In addition, delayed apoptosis becomes an advantage for this vectorization process. Whether strictly for oncolytic purposes or as a genetic backbone for the delivery of a recombinant therapeutic agent, this ability of ZIKV to induce delayed cell death makes it a potentially good vector for antitumor therapy. However, these beneficial effects may be mitigated by the ability of ZIKV to persist in some tissues, with detrimental effects on patients. Despite this, studies have shown that, in dogs with glioblastoma, the use of a Brazilian ZIKV reduced tumor size and did not induce clinical side effects [164]. Further research is needed to decipher the potential of ZIKV as an oncolytic treatment for brain cancers [153,154].

6. Discussion and Conclusions

In the last decade, a series of epidemics has put global human health at risk. This pressure is due to the threat of mainly viral pathogens that do not spare any region, regardless of the economic levels or medical capacities of countries. In this context, better knowledge of infectious agents, their mechanisms of dissemination/transmission in the environment, and their interactions with their hosts, particularly humans, is essential. This is necessary to face the risks of viral emergence or re-emergence as well as current and future epidemics and pandemics. Understanding the mechanics of host–pathogen interactions at the cellular and molecular levels is also essential for the development of preventive and/or therapeutic strategies. Among the cellular and molecular responses that are crucial for eliminating the pathogen, but that may also be involved in pathological

processes is cell death by apoptosis. Just as humans evaluate the benefits and risks of an action, the cell must make a choice between survival and self-killing to resolve an infection. The decision to commit suicide is based on a precise control of pro-apoptotic and anti-apoptotic factors. The process of ZIKV infection seems to be a wonderful example of manipulation of this pro-death or survival balance of the host cell.

ZIKV, similar to other flaviviruses (such as JEV, DENV or WNV), is capable of inducing apoptosis in various types of infected cells. Therefore, an excess of placental cell apoptosis, early in gestation, seems to be one of the main causes of horizontal maternal–fetal transmission. Dissemination of the virus into fetal tissues, infection of the brain, and early apoptosis of neuronal progenitors seem to be involved in Zika pathology and SCZ development (Figure 5).

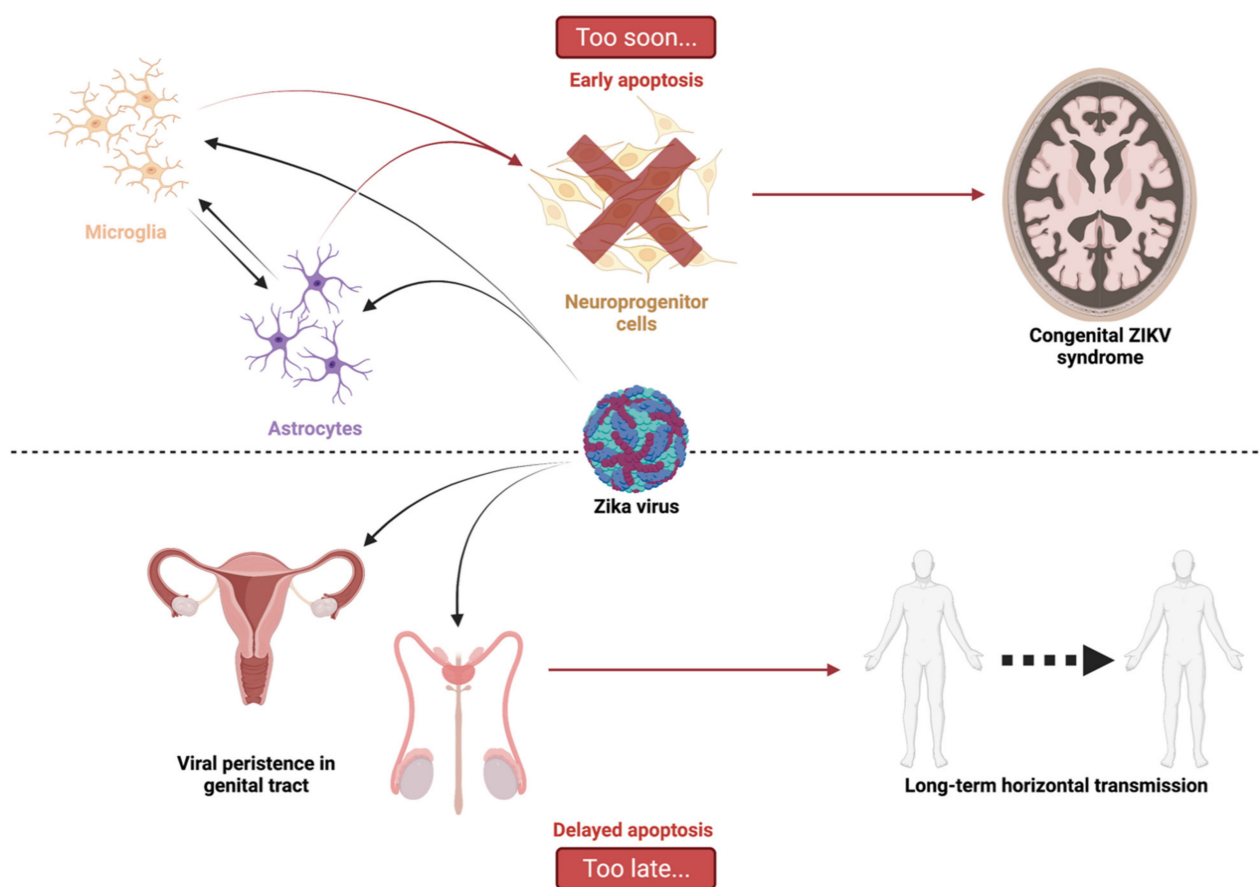


Figure 5. Too soon or too late, graphical abstract. ZIKV-related apoptosis is ambivalent. On one hand, the virus transmission to the central nervous system via microglia and astrocytes induces early apoptosis of neuroprogenitor cells. This leads to a set of symptoms and defects grouped under the term of ZIKV congenital syndrome. On the other hand, ZIKV has been shown to persist for a while in infected organisms due to delayed apoptosis. Persisting in the genital tract could lead to sexual transmission that is unusual for an arbovirus.

Conversely, cell death by apoptosis has been shown to occur late in many cell types. This delay in the onset of cell death involves anti-apoptotic proteins such as Bcl-2, whose stability and half-life are increased by a mechanism that remains to be defined. It also involves a defect in the induction of the expression of pro-apoptotic factors (BIM, PUMA, NOXA...) that are cruelly lacking to tip the balance. This defect is in part due to the ability of ZIKV to 'hack' the communication pathway between ER stress, UPR, and apoptosis by inhibiting the CHOP factor. Other studies have described that paraptosis is sometimes induced by ZIKV, with hyper vacuolation of cells without caspase activation. This could be

in place of apoptotic death and apparently allows the virus to replicate more abundantly in the cell [165]. This confirms that apoptosis is detrimental to the virus and this raises the question of the impact of delayed apoptosis on pathophysiological processes and viral persistence following ZIKV infection. A persistence capacity of ZIKV is established. The virus, which remains in the genital tract and is secreted for a long time in the semen, is the cause of sexual transmission (Figure 5). In addition to the complications observed in newborns, the evidence of neuropathologies in children after birth [132] raises questions about the mechanisms involved long after the acute infection. Recent work also suggests that ZIKV exposure may contribute to the development of neurodegenerative pathologies in adults in the longer term [103,166]. Of note, data on microcephalic brains of ZIKV-infected neonates have shown an increase in Bcl-2 protein, opening up the hypothesis of viral persistence mediated by overexpression of anti-apoptotic proteins [124]. Taken together, these insights into ZIKV infection confirm the interest in understanding the mechanisms of apoptosis control. This understanding is important for the development of antiviral therapies based on the restoration of the ability of infected cells to die. It could also be useful in the fight against late-onset forms of Zika. This understanding is ultimately important for considering the use of this singular virus in oncolytic virotherapy.

Author Contributions: Conceptualization, P.K.-T. and W.V.; Methodology; resources; writing—original draft preparation, J.T., D.E.S., G.L., M.K. and C.C.; Figure drawings, G.L., M.K. and C.C.; Writing—review and editing, P.K.-T.; Visualization, P.K.-T. and W.V.; Supervision, P.K.-T.; Funding acquisition, P.D., P.K.-T. and W.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the ZIKAlert project (European Union-Région Réunion program under grant agreement no. SYNERGY: RE0001902, with P.D. as project leader) and was supported by the Federation BioST from Reunion Island University by the Zikapone project (with P.K.-T. as project leader). J.T. has a PhD degree scholarship from Réunion University (Ecole doctorale STS) funded by DIREC/2021-0161. G.L. and D.E.S. hold a fellowship from the Regional Council of Reunion Island (European Union-Région Réunion). C.C. and M.K. have a PhD degree scholarship from Nantes University (Ecole doctorale BS) funded by the French ministry MEESR.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

ZIKV	Zika virus
PCD	Programmed cell death
CNS	Central Nervous System
ER	Endoplasmic Reticulum
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization
APAF-1	Apoptosis protease activating factor 1
PARP	Poly ADP-ribose polymerase
DISC	Death inducing signaling complex
UPR	Unresolved unfolded protein response
CHOP	C/EBP HOMologous Protein
BHV	Bovine herpesvirus 1
DENV	Dengue virus
WNV	West Nile virus
JEV	Japanese encephalitis virus
HSV	Herpes simplex virus HSV
MAVS	Mitochondrial antiviral-signaling protein
WHO	World Health Organization

CDC	Center for disease control
CZS	Congenital Zika syndrome
sfRNA	Small flavivirus RNA
CHIKV	Chikungunya virus
RRV	Ross River virus

References

- Weaver, S.C.; Costa, F.; Garcia-Blanco, M.A.; Ko, A.I.; Ribeiro, G.S.; Saade, G.; Shi, P.-Y.; Vasilakis, N. Zika Virus: History, Emergence, Biology, and Prospects for Control. *Antivir. Res.* **2016**, *130*, 69–80. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Krauer, F.; Riesen, M.; Reveiz, L.; Oladapo, O.T.; Martínez-Vega, R.; Porgo, T.V.; Haeffliger, A.; Broutet, N.J.; Low, N.; Group, W.Z.C.W. Zika Virus Infection as a Cause of Congenital Brain Abnormalities and Guillain–Barré Syndrome: Systematic Review. *PLOS Med.* **2017**, *14*, e1002203. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Plourde, A.R.; Bloch, E.M. A Literature Review of Zika Virus. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 7. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Jorgensen, I.; Rayamajhi, M.; Miao, E.A. Programmed Cell Death as a Defence against Infection. *Nat. Rev. Immunol.* **2017**, *17*, 151–164. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Thomson, B.J. Viruses and Apoptosis. *Int. J. Exp. Pathol.* **2001**, *82*, 65–76. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Gregory, C.D.; Devitt, A. The Macrophage and the Apoptotic Cell: An Innate Immune Interaction Viewed Simplistically? *Immunology* **2004**, *113*, 1–14. [\[CrossRef\]](#)
- Thimme, R.; Oldach, D.; Chang, K.-M.; Steiger, C.; Ray, S.C.; Chisari, F.V. Determinants of Viral Clearance and Persistence during Acute Hepatitis C Virus Infection. *J. Exp. Med.* **2001**, *194*, 1395–1406. [\[CrossRef\]](#)
- Huang, W.-C.; Abraham, R.; Shim, B.-S.; Choe, H.; Page, D.T. Zika Virus Infection during the Period of Maximal Brain Growth Causes Microcephaly and Corticospinal Neuron Apoptosis in Wild Type Mice. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 34793. [\[CrossRef\]](#)
- Ximenes, R.; Ramsay, L.C.; Miranda, R.N.; Morris, S.K.; Murphy, K.; Sander, B. Health Outcomes Associated with Zika Virus Infection in Humans: A Systematic Review of Systematic Reviews. *BMJ Open* **2019**, *9*, e032275. [\[CrossRef\]](#)
- Stassen, L.; Armitage, C.; van der Heide, D.; Beagley, K.; Frentiu, F. Zika Virus in the Male Reproductive Tract. *Viruses* **2018**, *10*, 198. [\[CrossRef\]](#)
- Meier, P.; Finch, A.; Evan, G. Apoptosis in Development. *Nature* **2000**, *407*, 796–801. [\[CrossRef\]](#)
- Kerr, J.F.R.; Wyllie, A.H.; Currie, A.R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer* **1972**, *26*, 239–257. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Galluzzi, L.; Vitale, I.; Aaronson, S.A.; Abrams, J.M.; Adam, D.; Agostinis, P.; Alnemri, E.S.; Altucci, L.; Amelio, I.; Andrews, D.W.; et al. Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 486–541. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Shalini, S.; Dorstyn, L.; Dawar, S.; Kumar, S. Old, New and Emerging Functions of Caspases. *Cell Death Differ.* **2015**, *22*, 526–539. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bender, T.; Martinou, J.-C. Where Killers Meet—Permeabilization of the Outer Mitochondrial Membrane during Apoptosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a011106. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kale, J.; Osterlund, E.J.; Andrews, D.W. BCL-2 Family Proteins: Changing Partners in the Dance towards Death. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 65–80. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Zhou, M.; Li, Y.; Hu, Q.; Bai, X.; Huang, W.; Yan, C.; Scheres, S.H.W.; Shi, Y. Atomic Structure of the Apoptosome: Mechanism of Cytochrome c—And DATP-Mediated Activation of Apaf-1. *Genes Dev.* **2015**, *29*, 2349–2361. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Malladi, S.; Challa-Malladi, M.; Fearnhead, H.O.; Bratton, S.B. The Apaf-1•procaspase-9 Apoptosome Complex Functions as a Proteolytic-Based Molecular Timer. *EMBO J.* **2009**, *28*, 1916–1925. [\[CrossRef\]](#)
- Tummers, B.; Green, D.R. Caspase-8: Regulating Life and Death. *Immunol. Rev.* **2017**, *277*, 76–89. [\[CrossRef\]](#)
- Stennicke, H.R.; Jürgensmeier, J.M.; Shin, H.; Deveraux, Q.; Wolf, B.B.; Yang, X.; Zhou, Q.; Ellerby, H.M.; Ellerby, L.M.; Bredesen, D.; et al. Pro-Caspase-3 Is a Major Physiologic Target of Caspase-8. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 27084–27090. [\[CrossRef\]](#)
- Wang, C.; Youle, R.J. The Role of Mitochondria in Apoptosis. *Annu. Rev. Genet.* **2009**, *43*, 95–118. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sano, R.; Reed, J.C. ER Stress-Induced Cell Death Mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Mol. Cell Res.* **2013**, *1833*, 3460–3470. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Xu, X.; Zhang, K.; Huang, Y.; Ding, L.; Chen, G.; Zhang, H.; Tong, D. Bovine Herpes Virus Type 1 Induces Apoptosis through Fas-Dependent and Mitochondria-Controlled Manner in Madin-Darby Bovine Kidney Cells. *Virol. J.* **2012**, *9*, 202. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- El-Bacha, T.; Midlej, V.; Pereira da Silva, A.P.; Silva da Costa, L.; Benchimol, M.; Galina, A.; Da Poian, A.T. Mitochondrial and Bioenergetic Dysfunction in Human Hepatic Cells Infected with Dengue 2 Virus. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Mol. Basis Dis.* **2007**, *1772*, 1158–1166. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Jordan, T.X.; Randall, G. Flavivirus Modulation of Cellular Metabolism. *Curr. Opin. Virol.* **2016**, *19*, 7–10. [\[CrossRef\]](#)
- Thaker, S.K.; Ch'ng, J.; Christofk, H.R. Viral Hijacking of Cellular Metabolism. *BMC Biol.* **2019**, *17*, 59. [\[CrossRef\]](#)
- Wang, Q.; Xin, X.; Wang, T.; Wan, J.; Ou, Y.; Yang, Z.; Yu, Q.; Zhu, L.; Guo, Y.; Wu, Y.; et al. Japanese Encephalitis Virus Induces Apoptosis and Encephalitis by Activating the PERK Pathway. *J. Virol.* **2019**, *93*, e00887-19. [\[CrossRef\]](#)
- Johnston, B.P.; McCormick, C. Herpesviruses and the Unfolded Protein Response. *Viruses* **2019**, *12*, 17. [\[CrossRef\]](#)

29. Mukherjee, S.; Singh, N.; Sengupta, N.; Fatima, M.; Seth, P.; Mahadevan, A.; Shankar, S.K.; Bhattacharyya, A.; Basu, A. Japanese Encephalitis Virus Induces Human Neural Stem/Progenitor Cell Death by Elevating GRP78, PHB and HnRNPC through ER Stress. *Cell Death Dis.* **2018**, *8*, e2556. [CrossRef]
30. Catteau, A.; Roué, G.; Yuste, V.J.; Susin, S.A.; Desprès, P. Expression of Dengue ApoptoM Sequence Results in Disruption of Mitochondrial Potential and Caspase Activation. *Biochimie* **2003**, *85*, 789–793. [CrossRef]
31. Vanwalscappel, B.; Haddad, J.G.; Almokdad, R.; Decotter, J.; Gadea, G.; Desprès, P. Zika M Oligopeptide ZAMP Confers Cell Death-Promoting Capability to a Soluble Tumor-Associated Antigen through Caspase-3/7 Activation. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9578. [CrossRef] [PubMed]
32. Pan, Y.; Cheng, A.; Wang, M.; Yin, Z.; Jia, R. The Dual Regulation of Apoptosis by Flavivirus. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 654494. [CrossRef] [PubMed]
33. Okamoto, T.; Suzuki, T.; Kusakabe, S.; Tokunaga, M.; Hirano, J.; Miyata, Y.; Matsuura, Y. Regulation of Apoptosis during Flavivirus Infection. *Viruses* **2017**, *9*, 243. [CrossRef] [PubMed]
34. Long, X.; Li, Y.; Qi, Y.; Xu, J.; Wang, Z.; Zhang, X.; Zhang, D.; Zhang, L.; Huang, J. XAF1 Contributes to Dengue Virus-Induced Apoptosis in Vascular Endothelial Cells. *FASEB J.* **2013**, *27*, 1062–1073. [CrossRef] [PubMed]
35. Del Carmen Parquet, M.; Kumatori, A.; Hasebe, F.; Morita, K.; Igarashi, A. West Nile Virus-Induced Bax-Dependent Apoptosis. *FEBS Lett.* **2001**, *500*, 17–24. [CrossRef]
36. Maelfait, J.; Liverpool, L.; Rehwinkel, J. Nucleic Acid Sensors and Programmed Cell Death. *J. Mol. Biol.* **2020**, *432*, 552–568. [CrossRef]
37. Yu, C.-Y.; Chiang, R.-L.; Chang, T.-H.; Liao, C.-L.; Lin, Y.-L. The Interferon Stimulator Mitochondrial Antiviral Signaling Protein Facilitates Cell Death by Disrupting the Mitochondrial Membrane Potential and by Activating Caspases. *J. Virol.* **2010**. [CrossRef]
38. Vince, J.E.; Tschopp, J. IRF-3 Partners Bax in a Viral-Induced Dance Macabre. *EMBO J.* **2010**, *29*, 1627–1628. [CrossRef]
39. Knowlton, J.J.; Dermody, T.S.; Holm, G.H. Apoptosis Induced by Mammalian Reovirus Is Beta Interferon (IFN) Independent and Enhanced by IFN Regulatory Factor 3- and NF-KB-Dependent Expression of Noxa. *J. Virol.* **2012**, *86*, 1650–1660. [CrossRef]
40. Valadão, A.L.C.; Aguiar, R.S.; de Arruda, L.B. Interplay between Inflammation and Cellular Stress Triggered by Flaviviridae Viruses. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1233. [CrossRef]
41. Nguyen, L.N.; Kanneganti, T.-D. PANoptosis in Viral Infection: The Missing Puzzle Piece in the Cell Death Field. *J. Mol. Biol.* **2021**, 167249. [CrossRef] [PubMed]
42. Boyer, S.; Calvez, E.; Chouin-Carneiro, T.; Diallo, D.; Failloux, A.-B. An Overview of Mosquito Vectors of Zika Virus. *Microbes Infect.* **2018**, *20*, 646–660. [CrossRef] [PubMed]
43. Dick, G.W.A.; Kitchen, S.F.; Haddow, A.J. Zika Virus (I). Isolations and Serological Specificity. *Trop. Med. Hyg.* **1952**, *46*, 509–520. [CrossRef]
44. Smithburn, K.C. Neutralizing Antibodies Against Certain Recently Isolated Viruses in the Sera of Human Beings Residing in East Africa. *J. Immunol.* **1952**, *69*, 223–234. [PubMed]
45. Duffy, M.R.; Chen, T.-H.; Hancock, W.T.; Powers, A.M.; Kool, J.L.; Lanciotti, R.S.; Pretrick, M.; Marfel, M.; Holzbauer, S.; Dubray, C.; et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 2536–2543. [CrossRef] [PubMed]
46. Cao-Lormeau, V.-M.; Roche, C.; Teissier, A.; Robin, E.; Berry, A.-L.; Mallet, H.-P.; Sall, A.A.; Musso, D. Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 1084–1086. [CrossRef]
47. Campos, G.S.; Bandeira, A.C.; Sardi, S.I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 1885–1886. [CrossRef]
48. Ye, Q.; Liu, Z.-Y.; Han, J.-F.; Jiang, T.; Li, X.-F.; Qin, C.-F. Genomic Characterization and Phylogenetic Analysis of Zika Virus Circulating in the Americas. *Infect. Genet. Evol.* **2016**, *43*, 43–49. [CrossRef]
49. Yadav, P.D.; Malhotra, B.; Sapkal, G.; Nyayanit, D.A.; Deshpande, G.; Gupta, N.; Padinjarematthil, U.T.; Sharma, H.; Sahay, R.R.; Sharma, P.; et al. Zika Virus Outbreak in Rajasthan, India in 2018 Was Caused by a Virus Endemic to Asia. *Infect. Genet. Evol.* **2019**, *69*, 199–202. [CrossRef]
50. Giron, S.; Franke, F.; Decoppet, A.; Cadiou, B.; Travaglini, T.; Thirion, L.; Durand, G.; Jeannin, C.; L’Ambert, G.; Grard, G.; et al. Vector-Borne Transmission of Zika Virus in Europe, Southern France, August 2019. *Eurosurveillance* **2019**, *24*, 1900655. [CrossRef]
51. Information for Travellers Visiting Countries with Zika Virus Transmission. Available online: <https://www.who.int/publications/m/item/information-for-travellers-visiting-countries-with-zika-virus-transmission> (accessed on 21 December 2021).
52. McKenzie, B.A.; Wilson, A.E.; Zohdy, S. Aedes Albopictus Is a Competent Vector of Zika Virus: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0216794. [CrossRef] [PubMed]
53. Counotte, M.J.; Kim, C.R.; Wang, J.; Bernstein, K.; Deal, C.D.; Broutet, N.J.N.; Low, N. Sexual Transmission of Zika Virus and Other Flaviviruses: A Living Systematic Review. *PLoS Med.* **2018**, *15*, e1002611. [CrossRef] [PubMed]
54. WHO | Sexual Transmission of Zika Virus: Current Status, Challenges and Research Priorities. Available online: <http://www.who.int/reproductivehealth/zika/sexual-transmission-experts-meeting/en/> (accessed on 21 December 2021).
55. Chan, J.F.W.; Choi, G.K.Y.; Yip, C.C.Y.; Cheng, V.C.C.; Yuen, K.-Y. Zika Fever and Congenital Zika Syndrome: An Unexpected Emerging Arboviral Disease. *J. Infect.* **2016**, *72*, 507–524. [CrossRef] [PubMed]
56. Noorbakhsh, F.; Abdolmohammadi, K.; Fatahi, Y.; Dalili, H.; Rasoolinejad, M.; Rezaei, F.; Salehi-Vaziri, M.; Zahra SHAFIEI-JANDAGHI, N.; Shamsi GOOSHKI, E.; Zaim, M.; et al. Zika Virus Infection, Basic and Clinical Aspects: A Review Article. *Iran. J. Public Health.* **2019**. [CrossRef]

57. Cao-Lormeau, V.-M.; Blake, A.; Mons, S.; Lastère, S.; Roche, C.; Vanhomwegen, J.; Dub, T.; Baudouin, L.; Teissier, A.; Larre, P.; et al. Guillain-Barré Syndrome Outbreak Associated with Zika Virus Infection in French Polynesia: A Case-Control Study. *Lancet* **2016**, *387*, 1531–1539. [\[CrossRef\]](#)
58. Rivera-Correa, J.; de Siqueira, I.C.; Mota, S.; do Rosário, M.S.; Pereira de Jesus, P.A.; Alcantara, L.C.J.; Ernst, J.D.; Rodriguez, A. Anti-Ganglioside Antibodies in Patients with Zika Virus Infection-Associated Guillain-Barré Syndrome in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13*, e0007695. [\[CrossRef\]](#)
59. Mlakar, J.; Korva, M.; Tul, N.; Popović, M.; Poljšak-Prijatelj, M.; Mraz, J.; Kolenc, M.; Resman Rus, K.; Vesnaver Vipotnik, T.; Fabjan Vodusek, V.; et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 951–958. [\[CrossRef\]](#)
60. Da Cunha, A.J.L.A.; de Magalhães-Barbosa, M.C.; Lima-Setta, F.; Medronho, R.; de Andrade, R.; Prata-Barbosa, A. Microcephaly Case Fatality Rate Associated with Zika Virus Infection in Brazil: Current Estimates. *Pediatric Infect. Dis. J.* **2017**, *36*, 528–530. [\[CrossRef\]](#)
61. Costa, M.C.N.; Cardim, L.L.; Teixeira, M.G.; Barreto, M.L.; Carvalho-Sauer, R.d.C.O.; Barreto, F.R.; Carvalho, M.S.I.; Oliveira, W.K.; França, G.V.A.; Carmo, E.H.; et al. Case Fatality Rate Related to Microcephaly Congenital Zika Syndrome and Associated Factors: A Nationwide Retrospective Study in Brazil. *Viruses* **2020**, *12*, 1228. [\[CrossRef\]](#)
62. Paz-Bailey, G.; Rosenberg, E.S.; Doyle, K.; Munoz-Jordan, J.; Santiago, G.A.; Klein, L.; Perez-Padilla, J.; Medina, F.A.; Waterman, S.H.; Adams, L.E.; et al. Persistence of Zika Virus in Body Fluids—Final Report. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 1234–1243. [\[CrossRef\]](#)
63. Campos, G.S.; Hughes Carvalho, R.; Bandeira, A.C.; Reboredo-Oliveira, L.; dos Santos Costa, R.; Figueiredo, C.A.; Sardi, S.I. New Challenge for Zika Virus Infection: Human Reservoirs? *Viral Immunol.* **2020**, *33*, 489–492. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Stone, M.; Bakkour, S.; Lanteri, M.C.; Brambilla, D.; Simmons, G.; Bruhn, R.; Kaidarova, Z.; Lee, T.-H.; Orlando Alsina, J.; Williamson, P.C.; et al. Zika Virus RNA and IgM Persistence in Blood Compartments and Body Fluids: A Prospective Observational Study. *Lancet Infect. Dis.* **2020**, *20*, 1446–1456. [\[CrossRef\]](#)
65. Petersen, L.R.; Jamieson, D.J.; Powers, A.M.; Honein, M.A. Zika Virus. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 1552–1563. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Lebeau, G.; Lagrave, A.; Ogire, E.; Grondin, L.; Seriacaroupin, S.; Moutoussamy, C.; Mavingui, P.; Hoarau, J.-J.; Roche, M.; Krejbich-Trotot, P.; et al. Viral Toxin NS1 Implication in Dengue Pathogenesis Making It a Pivotal Target in Development of Efficient Vaccine. *Vaccines* **2021**, *9*, 946. [\[CrossRef\]](#)
67. Mazeaud, C.; Freppel, W.; Chatel-Chaix, L. The Multiples Fates of the Flavivirus RNA Genome During Pathogenesis. *Front. Genet.* **2018**, *9*, 595. [\[CrossRef\]](#)
68. Lowe, R.; Barcellos, C.; Brasil, P.; Cruz, O.; Honório, N.; Kuper, H.; Carvalho, M. The Zika Virus Epidemic in Brazil: From Discovery to Future Implications. *IJERPH* **2018**, *15*, 96. [\[CrossRef\]](#)
69. de Aragao, M.F.V.; van der Linden, V.; Brainer-Lima, A.M.; Coeli, R.R.; Rocha, M.A.; da Silva, P.S.; de Carvalho, M.D.C.G.; van der Linden, A.; de Holanda, A.C.; Valenca, M.M. Clinical Features and Neuroimaging (CT and MRI) Findings in Presumed Zika Virus Related Congenital Infection and Microcephaly: Retrospective Case Series Study. *BMJ* **2016**, *353*, i1901. [\[CrossRef\]](#)
70. Coyne, C.B.; Lazear, H.M. Zika Virus—Reigniting the TORCH. *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, *14*, 707–715. [\[CrossRef\]](#)
71. Gadea, G.; Bos, S.; Krejbich-Trotot, P.; Clain, E.; Viranaicken, W.; El-Kalamouni, C.; Mavingui, P.; Desprès, P. A Robust Method for the Rapid Generation of Recombinant Zika Virus Expressing the GFP Reporter Gene. *Virology* **2016**, *497*, 157–162. [\[CrossRef\]](#)
72. Miner, J.J.; Diamond, M.S. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host Microbe* **2017**, *21*, 134–142. [\[CrossRef\]](#)
73. Pena, L.J.; Miranda Guarines, K.; Duarte Silva, A.J.; Sales Leal, L.R.; Mendes Félix, D.; Silva, A.; de Oliveira, S.A.; Junqueira Ayres, C.F.; Júnior, A.S.; de Freitas, A.C. In Vitro and in Vivo Models for Studying Zika Virus Biology. *J. Gen. Virol.* **2018**, *99*, 1529–1550. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Bayless, N.L.; Greenberg, R.S.; Swigut, T.; Wysocka, J.; Blish, C.A. Zika Virus Infection Induces Cranial Neural Crest Cells to Produce Cytokines at Levels Detrimental for Neurogenesis. *Cell Host Microbe* **2016**, *20*, 423–428. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
75. Dang, J.; Tiwari, S.K.; Lichinchi, G.; Qin, Y.; Patil, V.S.; Eroshkin, A.M.; Rana, T.M. Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. *Cell Stem Cell* **2016**, *19*, 258–265. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Osuna, C.E.; Lim, S.-Y.; Deleage, C.; Griffin, B.D.; Stein, D.; Schroeder, L.T.; Omange, R.; Best, K.; Luo, M.; Hraber, P.T.; et al. Zika Viral Dynamics and Shedding in Rhesus and Cynomolgus Macaques. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 1448–1455. [\[CrossRef\]](#)
77. Marrazzo, P.; Cricca, M.; Nastasi, C. Are the Organoid Models an Invaluable Contribution to ZIKA Virus Research? *Pathogens* **2021**, *10*, 1233. [\[CrossRef\]](#)
78. Garcez, P.P.; Loiola, E.C.; Madeiro da Costa, R.; Higa, L.M.; Trindade, P.; Delvecchio, R.; Nascimento, J.M.; Brindeiro, R.; Tanuri, A.; Rehen, S.K. Zika Virus Impairs Growth in Human Neurospheres and Brain Organoids. *Science* **2016**, *352*, 816–818. [\[CrossRef\]](#)
79. Tabata, T.; Pettitt, M.; Puerta-Guardo, H.; Michlmayr, D.; Wang, C.; Fang-Hoover, J.; Harris, E.; Pereira, L. Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell Host Microbe* **2016**, *20*, 155–166. [\[CrossRef\]](#)
80. Butsabong, T.; Felipe, M.; Campagnolo, P.; Maringer, K. The Emerging Role of Perivascular Cells (Pericytes) in Viral Pathogenesis. *J. Gen. Virol.* **2021**, *102*. [\[CrossRef\]](#)
81. Frumence, E.; Roche, M.; Krejbich-Trotot, P.; El-Kalamouni, C.; Nativel, B.; Rondeau, P.; Missé, D.; Gadea, G.; Viranaicken, W.; Desprès, P. The South Pacific Epidemic Strain of Zika Virus Replicates Efficiently in Human Epithelial A549 Cells Leading to IFN- β Production and Apoptosis Induction. *Virology* **2016**, *493*, 217–226. [\[CrossRef\]](#)

82. Wu, Y.; Liu, Q.; Zhou, J.; Xie, W.; Chen, C.; Wang, Z.; Yang, H.; Cui, J. Zika Virus Evades Interferon-Mediated Antiviral Response through the Co-Operation of Multiple Nonstructural Proteins in Vitro. *Cell Discov.* **2017**, *3*, 17006. [\[CrossRef\]](#)
83. Souza, B.S.F.; Sampaio, G.L.A.; Pereira, C.S.; Campos, G.S.; Sardi, S.I.; Freitas, L.A.R.; Figueira, C.P.; Paredes, B.D.; Nonaka, C.K.V.; Azevedo, C.M.; et al. Zika Virus Infection Induces Mitosis Abnormalities and Apoptotic Cell Death of Human Neural Progenitor Cells. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 39775. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
84. Tang, H.; Hammack, C.; Ogden, S.C.; Wen, Z.; Qian, X.; Li, Y.; Yao, B.; Shin, J.; Zhang, F.; Lee, E.M.; et al. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell* **2016**, *18*, 587–590. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
85. Liu, J.; Li, Q.; Li, X.; Qiu, Z.; Li, A.; Liang, W.; Chen, H.; Cai, X.; Chen, X.; Duan, X.; et al. Zika Virus Envelope Protein Induces G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis via an Intrinsic Cell Death Signaling Pathway in Neuroendocrine PC12 Cells. *Int. J. Biol. Sci.* **2018**, *14*, 1099–1108. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
86. Suzuki, T.; Okamoto, T.; Katoh, H.; Sugiyama, Y.; Kusakabe, S.; Tokunaga, M.; Hirano, J.; Miyata, Y.; Fukuhara, T.; Ikawa, M.; et al. Infection with Flaviviruses Requires BCLXL for Cell Survival. *PLoS Pathog.* **2018**, *14*, e1007299. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
87. Turpin, J.; Frumence, E.; Desprès, P.; Viranaïcken, W.; Krejbich-Trotot, P. The ZIKA Virus Delays Cell Death Through the Anti-Apoptotic Bcl-2 Family Proteins. *Cells* **2019**, *8*, 1338. [\[CrossRef\]](#)
88. Limonta, D.; Jovel, J.; Kumar, A.; Airo, A.; Hou, S.; Saito, L.; Branton, W.; Ka-Shu Wong, G.; Mason, A.; Power, C.; et al. Human Fetal Astrocytes Infected with Zika Virus Exhibit Delayed Apoptosis and Resistance to Interferon: Implications for Persistence. *Viruses* **2018**, *10*, 646. [\[CrossRef\]](#)
89. Kumar, A.; Jovel, J.; Lopez-Orozco, J.; Limonta, D.; Airo, A.M.; Hou, S.; Stryapunina, I.; Fibke, C.; Moore, R.B.; Hobman, T.C. Human Sertoli Cells Support High Levels of Zika Virus Replication and Persistence. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 5477. [\[CrossRef\]](#)
90. Muthuraj, P.G.; Sahoo, P.K.; Kraus, M.; Bruett, T.; Annamalai, A.S.; Pattnaik, A.; Pattnaik, A.K.; Byrareddy, S.N.; Natarajan, S.K. Zika Virus Infection Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Placental Trophoblasts. *Cell Death Discov.* **2021**, *7*, 24. [\[CrossRef\]](#)
91. Chen, J.; Yang, Y.; Chen, J.; Zhou, X.; Dong, Z.; Chen, T.; Yang, Y.; Zou, P.; Jiang, B.; Hu, Y.; et al. Zika Virus Infects Renal Proximal Tubular Epithelial Cells with Prolonged Persistency and Cytopathic Effects. *Emerg. Microbes Infect.* **2017**, *6*, 1–7. [\[CrossRef\]](#)
92. Turpin, J.; El-Safadi, D.; Lebeau, G.; Frumence, E.; Desprès, P.; Viranaïcken, W.; Krejbich-Trotot, P. CHOP Pro-Apoptotic Transcriptional Program in Response to ER Stress Is Hacked by Zika Virus. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3750. [\[CrossRef\]](#)
93. Limonta, D.; Jovel, J.; Kumar, A.; Lu, J.; Hou, S.; Airo, A.M.; Lopez-Orozco, J.; Wong, C.P.; Saito, L.; Branton, W.; et al. Fibroblast Growth Factor 2 Enhances Zika Virus Infection in Human Fetal Brain. *J. Infect. Dis.* **2019**, *220*, 1377–1387. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
94. Liu, H.; Liao, H.-M.; Li, B.; Tsai, S.; Hung, G.-C.; Lo, S.-C. Comparative Genomics, Infectivity and Cytopathogenicity of American Isolates of Zika Virus That Developed Persistent Infections in Human Embryonic Kidney (HEK293) Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3035. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
95. Barnard, T.; Rajah, M.; Sagan, S. Contemporary Zika Virus Isolates Induce More DsRNA and Produce More Negative-Strand Intermediate in Human Astrocytoma Cells. *Viruses* **2018**, *10*, 728. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
96. Han, X.; Wang, J.; Yang, Y.; Qu, S.; Wan, F.; Zhang, Z.; Wang, R.; Li, G.; Cong, H. Zika Virus Infection Induced Apoptosis by Modulating the Recruitment and Activation of Proapoptotic Protein Bax. *J. Virol.* **2021**, *95*, e01445-20. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
97. Auriti, C.; De Rose, D.U.; Santisi, A.; Martini, L.; Piersigilli, F.; Bersani, I.; Ronchetti, M.P.; Caforio, L. Pregnancy and Viral Infections: Mechanisms of Fetal Damage, Diagnosis and Prevention of Neonatal Adverse Outcomes from Cytomegalovirus to SARS-CoV-2 and Zika Virus. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2021**, *1867*, 166198. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
98. Chiu, C.-F.; Chu, L.-W.; Liao, I.-C.; Simanjuntak, Y.; Lin, Y.-L.; Juan, C.-C.; Ping, Y.-H. The Mechanism of the Zika Virus Crossing the Placental Barrier and the Blood-Brain Barrier. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 214. [\[CrossRef\]](#)
99. Pereira, L. Congenital Viral Infection: Traversing the Uterine-Placental Interface. *Annu. Rev. Virol.* **2018**, *5*, 273–299. [\[CrossRef\]](#)
100. Rabelo, K.; de Souza, L.J.; Salomão, N.G.; Machado, L.N.; Pereira, P.G.; Portari, E.A.; Basílio-de-Oliveira, R.; Dos Santos, F.B.; Neves, L.D.; Morgade, L.F.; et al. Zika Induces Human Placental Damage and Inflammation. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 2146. [\[CrossRef\]](#)
101. Sen Santara, S.; Crespo, Â.C.; Mulik, S.; Ovies, C.; Boulenouar, S.; Strominger, J.L.; Lieberman, J. Decidual NK Cells Kill Zika Virus-Infected Trophoblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*, e2115410118. [\[CrossRef\]](#)
102. Ropidi, M.I.M.; Khazali, A.S.; Rashid, N.N.; Yusof, R. Endoplasmic reticulum: A focal point of Zika virus infection. *J. Biomed. Sci.* **2020**, *27*, 27. [\[CrossRef\]](#)
103. Alfano, C.; Gladwyn-Ng, I.; Couderc, T.; Lecuit, M.; Nguyen, L. The Unfolded Protein Response: A Key Player in Zika Virus-Associated Congenital Microcephaly. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 94. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
104. Gladwyn-Ng, I.; Cordon-Barris, L.; Alfano, C.; Creppe, C.; Couderc, T.; Morelli, G.; Thelen, N.; America, M.; Bessières, B.; Encha-Razavi, F.; et al. Stress-Induced Unfolded Protein Response Contributes to Zika Virus-Associated Microcephaly. *Nat. Neurosci.* **2018**, *21*, 63–71. [\[CrossRef\]](#)
105. Tan, Z.; Zhang, W.; Sun, J.; Fu, Z.; Ke, X.; Zheng, C.; Zhang, Y.; Li, P.; Liu, Y.; Hu, Q.; et al. ZIKV Infection Activates the IRE1-XBP1 and ATF6 Pathways of Unfolded Protein Response in Neural Cells. *J. Neuroinflamm.* **2018**, *15*, 275. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
106. Turpin, J.; Frumence, E.; Harrabi, W.; Haddad, J.G.; El Kalamouni, C.; Desprès, P.; Krejbich-Trotot, P.; Viranaïcken, W. Zika Virus Subversion of Chaperone GRP78/BiP Expression in A549 Cells during UPR Activation. *Biochimie* **2020**, *175*, 99–105. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
107. Chen, Y.; Brandizzi, F. IRE1: ER Stress Sensor and Cell Fate Executor. *Trends Cell Biol.* **2013**, *23*, 547–555. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

108. Zinszner, H.; Kuroda, M.; Wang, X.; Batchvarova, N.; Lightfoot, R.T.; Remotti, H.; Stevens, J.L.; Ron, D. CHOP Is Implicated in Programmed Cell Death in Response to Impaired Function of the Endoplasmic Reticulum. *Genes Dev.* **1998**, *12*, 982–995. [\[CrossRef\]](#)
109. Quicke, K.M.; Bowen, J.R.; Johnson, E.L.; McDonald, C.E.; Ma, H.; O'Neal, J.T.; Rajakumar, A.; Wrammert, J.; Rimawi, B.H.; Pulendran, B.; et al. Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. *Cell Host Microbe* **2016**, *20*, 83–90. [\[CrossRef\]](#)
110. Tabata, T.; Pettitt, M.; Puerta-Guardo, H.; Michlmayr, D.; Harris, E.; Pereira, L. Zika Virus Replicates in Proliferating Cells in Explants From First-Trimester Human Placentas, Potential Sites for Dissemination of Infection. *J. Infect. Dis.* **2018**, *217*, 1202–1213. [\[CrossRef\]](#)
111. Ghouzzi, V.E.; Bianchi, F.T.; Molineris, I.; Mounce, B.C.; Berto, G.E.; Rak, M.; Lebon, S.; Aubry, L.; Tocco, C.; Gai, M.; et al. ZIKA Virus Elicits P53 Activation and Genotoxic Stress in Human Neural Progenitors Similar to Mutations Involved in Severe Forms of Genetic Microcephaly and P53. *Cell Death Dis.* **2016**, *7*, e2440. [\[CrossRef\]](#)
112. Lin, M.-Y.; Wang, Y.-L.; Wu, W.-L.; Wolseley, V.; Tsai, M.-T.; Radic, V.; Thornton, M.E.; Grubbs, B.H.; Chow, R.H.; Huang, I.-C. Zika Virus Infects Intermediate Progenitor Cells and Post-Mitotic Committed Neurons in Human Fetal Brain Tissues. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 14883. [\[CrossRef\]](#)
113. Schultz, V.; Barrie, J.A.; Donald, C.L.; Crawford, C.L.; Mullin, M.; Anderson, T.J.; Solomon, T.; Barnett, S.C.; Linington, C.; Kohl, A.; et al. Oligodendrocytes Are Susceptible to Zika Virus Infection in a Mouse Model of Perinatal Exposure: Implications for CNS Complications. *Glia* **2021**, *69*, 2023–2036. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
114. Yan, Y.; Zhang, X.; Wang, G.; Cheng, X.; Yan, Y.; Fu, Y.; Yang, X.; Jiang, Z. Zika Virus Induces Abnormal Cranial Osteogenesis by Negatively Affecting Cranial Neural Crest Development. *Infect. Genet. Evol.* **2019**, *69*, 176–189. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
115. Martinot, A.J.; Abbink, P.; Afacan, O.; Prohl, A.K.; Bronson, R.; Hecht, J.L.; Borducchi, E.N.; Larocca, R.A.; Peterson, R.L.; Rinaldi, W.; et al. Fetal Neuropathology in Zika Virus-Infected Pregnant Female Rhesus Monkeys. *Cell* **2018**, *173*, 1111–1122. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
116. Lancaster, M.A.; Knoblich, J.A. Generation of Cerebral Organoids from Human Pluripotent Stem Cells. *Nat. Protoc.* **2014**, *9*, 2329–2340. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
117. De Mendonça-Vieira, L.R.; Anibal-Silva, C.E.; Menezes-Neto, A.; de Azevedo, E.A.N.; Zanluqui, N.G.; Peron, J.P.S.; de Oliveira Franca, R.F. Reactive Oxygen Species (ROS) Are Not a Key Determinant for Zika Virus-Induced Apoptosis in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Viruses* **2021**, *13*, 2111. [\[CrossRef\]](#)
118. Zhang, F.; Hammack, C.; Ogden, S.C.; Cheng, Y.; Lee, E.M.; Wen, Z.; Qian, X.; Nguyen, H.N.; Li, Y.; Yao, B.; et al. Molecular Signatures Associated with ZIKV Exposure in Human Cortical Neural Progenitors. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 8610–8620. [\[CrossRef\]](#)
119. Lee, J.K.; Kim, J.-A.; Oh, S.-J.; Lee, E.-W.; Shin, O.S. Zika Virus Induces Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL)-Mediated Apoptosis in Human Neural Progenitor Cells. *Cells* **2020**, *9*, E2487. [\[CrossRef\]](#)
120. Rothan, H.A.; Fang, S.; Mahesh, M.; Byraredy, S.N. Zika Virus and the Metabolism of Neuronal Cells. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *56*, 2551–2557. [\[CrossRef\]](#)
121. Devhare, P.; Meyer, K.; Steele, R.; Ray, R.B.; Ray, R. Zika Virus Infection Dysregulates Human Neural Stem Cell Growth and Inhibits Differentiation into Neuroprogenitor Cells. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e3106. [\[CrossRef\]](#)
122. Bernhauerová, V.; Rezelj, V.V.; Vignuzzi, M. Modelling Degradation and Replication Kinetics of the Zika Virus In Vitro Infection. *Viruses* **2020**, *12*, 547. [\[CrossRef\]](#)
123. Krejbich-Trotot, P.; Denizot, M.; Hoarau, J.-J.; Jaffar-Bandjee, M.-C.; Das, T.; Gasque, P. Chikungunya Virus Mobilizes the Apoptotic Machinery to Invade Host Cell Defenses. *FASEB J.* **2011**, *25*, 314–325. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
124. De Sousa, J.R.; Azevedo, R.S.S.; Martins Filho, A.J.; Araujo, M.T.F.; Moutinho, E.R.C.; Baldez Vasconcelos, B.C.; Cruz, A.C.R.; Oliveira, C.S.; Martins, L.C.; Baldez Vasconcelos, B.H.; et al. Correlation between Apoptosis and in Situ Immune Response in Fatal Cases of Microcephaly Caused by Zika Virus. *Am. J. Pathol.* **2018**, *188*, 2644–2652. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
125. Mlera, L.; Melik, W.; Bloom, M.E. The Role of Viral Persistence in Flavivirus Biology. *Pathog. Dis.* **2014**, *71*, 137–163. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
126. Benedict, C.A.; Norris, P.S.; Ware, C.F. To Kill or Be Killed: Viral Evasion of Apoptosis. *Nat. Immunol.* **2002**, *3*, 1013–1018. [\[CrossRef\]](#)
127. Nagata, S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **2018**, *36*, 489–517. [\[CrossRef\]](#)
128. Quarleri, J.; Cevallos, C.; Delpino, M.V. Chapter One—Apoptosis in Infectious Diseases as a Mechanism of Immune Evasion and Survival. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*; Donev, R., Ed.; Apoptosis in Health and Disease—Part A; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2021; Volume 125, pp. 1–24.
129. Foy, B.D.; Kobylinski, K.C.; Foy, J.L.C.; Blitvich, B.J.; da Rosa, A.T.; Haddow, A.D.; Lanciotti, R.S.; Tesh, R.B. Probable Non-Vector-Borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 5. [\[CrossRef\]](#)
130. Nicastri, E.; Castilletti, C.; Liuzzi, G.; Iannetta, M.; Capobianchi, M.R.; Ippolito, G. Persistent Detection of Zika Virus RNA in Semen for Six Months after Symptom Onset in a Traveller Returning from Haiti to Italy, February 2016. *Eurosurveillance* **2016**, *21*, 30314. [\[CrossRef\]](#)
131. Alcendor, D.J. Zika Virus Infection of the Human Glomerular Cells: Implications for Viral Reservoirs and Renal Pathogenesis. *J. Infect. Dis.* **2017**, *216*, 162–171. [\[CrossRef\]](#)

132. Van der Linden, V.; Pessoa, A.; Dobyns, W.; Barkovich, A.J.; van der Linden, H.L., Jr.; Filho, E.L.R.; Ribeiro, E.M.; Leal, M.; de Araújo, C.; de Maria, F.V.V.; et al. Description of 13 Infants Born During October 2015–January 2016 With Congenital Zika Virus Infection Without Microcephaly at Birth—Brazil. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2016**, *65*, 1343–1348. [\[CrossRef\]](#)
133. Mulkey, S.B.; Arroyave-Wessel, M.; Peyton, C.; Bulas, D.I.; Fourzali, Y.; Jiang, J.; Russo, S.; McCarter, R.; Msall, M.E.; du Plessis, A.J.; et al. Neurodevelopmental Abnormalities in Children With In Utero Zika Virus Exposure Without Congenital Zika Syndrome. *JAMA Pediatr.* **2020**, *174*, 269. [\[CrossRef\]](#)
134. Palatini, U.; Miesen, P.; Carballar-Lejarazu, R.; Ometto, L.; Rizzo, E.; Tu, Z.; van Rij, R.P.; Bonizzoni, M. Comparative Genomics Shows That Viral Integrations Are Abundant and Express PiRNAs in the Arboviral Vectors *Aedes Aegypti* and *Aedes Albopictus*. *BMC Genom.* **2017**, *18*, 512. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
135. Offerdahl, D.K.; Dorward, D.W.; Hansen, B.T.; Bloom, M.E. Cytoarchitecture of Zika Virus Infection in Human Neuroblastoma and *Aedes Albopictus* Cell Lines. *Virology* **2017**, *501*, 54–62. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
136. Slonchak, A.; Hugo, L.E.; Freney, M.E.; Hall-Mendelin, S.; Amarilla, A.A.; Torres, F.J.; Setoh, Y.X.; Peng, N.Y.G.; Sng, J.D.J.; Hall, R.A.; et al. Zika Virus Noncoding RNA Suppresses Apoptosis and Is Required for Virus Transmission by Mosquitoes. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 2205. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
137. Clem, R.J. Arboviruses and Apoptosis: The Role of Cell Death in Determining Vector Competence. *J. Gen. Virol.* **2016**, *97*, 1033–1036. [\[CrossRef\]](#)
138. Medina-Magües, L.G.; Gergen, J.; Jasny, E.; Petsch, B.; Lopera-Madrid, J.; Medina-Magües, E.S.; Salas-Quinchucua, C.; Osorio, J.E. mRNA Vaccine Protects against Zika Virus. *Vaccines* **2021**, *9*, 1464. [\[CrossRef\]](#)
139. Xie, X.; Zou, J.; Shan, C.; Shi, P.-Y. Small Molecules and Antibodies for Zika Therapy. *J. Infect. Dis.* **2017**, *216*, S945–S950. [\[CrossRef\]](#)
140. Clain, E.; Sinigaglia, L.; Koishi, A.C.; Gorgette, O.; Gadea, G.; Viranaicken, W.; Krejbich-Trotot, P.; Mavingui, P.; Desprès, P.; Nunes Duarte dos Santos, C.; et al. Extract from *Aphloia Theiformis*, an Edible Indigenous Plant from Reunion Island, Impairs Zika Virus Attachment to the Host Cell Surface. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 10856. [\[CrossRef\]](#)
141. Baz, M.; Boivin, G. Antiviral Agents in Development for Zika Virus Infections. *Pharmaceuticals* **2019**, *12*, 101. [\[CrossRef\]](#)
142. Bernatchez, J.A.; Tran, L.T.; Li, J.; Luan, Y.; Siqueira-Neto, J.L.; Li, R. Drugs for the Treatment of Zika Virus Infection. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 470–489. [\[CrossRef\]](#)
143. Han, Y.; Mesplède, T. Investigational Drugs for the Treatment of Zika Virus Infection: A Preclinical and Clinical Update. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2018**, *27*, 951–962. [\[CrossRef\]](#)
144. Kumar, D.; Sharma, N.; Aarthy, M.; Singh, S.K.; Giri, R. Mechanistic Insights into Zika Virus NS3 Helicase Inhibition by Epigallocatechin-3-Gallate. *ACS Omega* **2020**, *5*, 11217–11226. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
145. Saiz, J.-C.; de Oya, N.J.; Blázquez, A.-B.; Escribano-Romero, E.; Martín-Acebes, M.A. Host-Directed Antivirals: A Realistic Alternative to Fight Zika Virus. *Viruses* **2018**, *10*, 453. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
146. Cooney, J.; Allison, C.; Preston, S.; Pellegrini, M. Therapeutic Manipulation of Host Cell Death Pathways to Facilitate Clearance of Persistent Viral Infections. *J. Leukoc. Biol.* **2018**, *103*, 287–293. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
147. Bulanova, D.; Ianevski, A.; Bugai, A.; Akimov, Y.; Kuivanen, S.; Paavilainen, H.; Kakkola, L.; Nandania, J.; Turunen, L.; Ohman, T.; et al. Antiviral Properties of Chemical Inhibitors of Cellular Anti-Apoptotic Bcl-2 Proteins. *Viruses* **2017**, *9*, 271. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
148. Rider, T.H.; Zook, C.E.; Boettcher, T.L.; Wick, S.T.; Pancoast, J.S.; Zusman, B.D. Broad-Spectrum Antiviral Therapeutics. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e22572. [\[CrossRef\]](#)
149. Kuivanen, S.; Beshpalov, M.M.; Nandania, J.; Ianevski, A.; Velagapudi, V.; De Brabander, J.K.; Kainov, D.E.; Vapalahti, O. Obatoclax, Saliphenylhalamide and Gemcitabine Inhibit Zika Virus Infection in Vitro and Differentially Affect Cellular Signaling, Transcription and Metabolism. *Antivir. Res.* **2017**, *139*, 117–128. [\[CrossRef\]](#)
150. Su, K.Y.; Balasubramaniam, V.R.M.T. Zika Virus as Oncolytic Therapy for Brain Cancer: Myth or Reality? *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2715. [\[CrossRef\]](#)
151. Lawler, S.E.; Speranza, M.-C.; Cho, C.-F.; Chiocca, E.A. Oncolytic Viruses in Cancer Treatment: A Review. *JAMA Oncol.* **2017**, *3*, 841. [\[CrossRef\]](#)
152. Vandenabeele, P.; Vandecasteele, K.; Bachert, C.; Krysko, O.; Krysko, D.V. Immunogenic Apoptotic Cell Death and Anticancer Immunity. In *Apoptosis in Cancer Pathogenesis and Anti-cancer Therapy*; Gregory, C.D., Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2016; Volume 930, pp. 133–149. ISBN 978-3-319-39404-6.
153. Zhu, Z.; Gorman, M.J.; McKenzie, L.D.; Chai, J.N.; Hubert, C.G.; Prager, B.C.; Fernandez, E.; Richner, J.M.; Zhang, R.; Shan, C.; et al. Zika Virus Has Oncolytic Activity against Glioblastoma Stem Cells. *J. Exp. Med.* **2017**, *214*, 2843–2857. [\[CrossRef\]](#)
154. Chen, Q.; Wu, J.; Ye, Q.; Ma, F.; Zhu, Q.; Wu, Y.; Shan, C.; Xie, X.; Li, D.; Zhan, X.; et al. Treatment of Human Glioblastoma with a Live Attenuated Zika Virus Vaccine Candidate. *mBio* **2018**, *9*. [\[CrossRef\]](#)
155. Zhu, Z.; Mesci, P.; Bernatchez, J.A.; Gimple, R.C.; Wang, X.; Schafer, S.T.; Wettersten, H.I.; Beck, S.; Clark, A.E.; Wu, Q.; et al. Zika Virus Targets Glioblastoma Stem Cells through a SOX2-Integrin $\alpha\beta 5$ Axis. *Cell Stem Cell* **2020**, *26*, 187–204. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
156. Nair, S.; Mazzocchi, L.; Jash, A.; Govero, J.; Bais, S.S.; Hu, T.; Fontes-Garfias, C.R.; Shan, C.; Okada, H.; Shresta, S.; et al. Zika Virus Oncolytic Activity Requires CD8⁺ T Cells and Is Boosted by Immune Checkpoint Blockade. *JCI Insight* **2020**, *6*, e144619. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
157. Mazar, J.; Li, Y.; Rosado, A.; Phelan, P.; Kedarinath, K.; Parks, G.D.; Alexander, K.A.; Westmoreland, T.J. Zika Virus as an Oncolytic Treatment of Human Neuroblastoma Cells Requires CD24. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0200358. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

-
158. Altevogt, P.; Sammar, M.; Hüser, L.; Kristiansen, G. Novel Insights into the Function of CD24: A Driving Force in Cancer. *Int. J. Cancer* **2021**, *148*, 546–559. [[CrossRef](#)]
 159. Zwernik, S.D.; Adams, B.H.; Raymond, D.A.; Warner, C.M.; Kassam, A.B.; Rovin, R.A.; Akhtar, P. AXL Receptor Is Required for Zika Virus Strain MR-766 Infection in Human Glioblastoma Cell Lines. *Mol. Ther.-Oncolytics* **2021**, *23*, 447–457. [[CrossRef](#)]
 160. Delaunay, T.; Nader, J.; Grard, M.; Farine, I.; Hedwig, V.; Foloppe, J.; Blondy, T.; Violland, M.; Pouliquen, D.; Grégoire, M.; et al. High Oncolytic Activity of a Double-Deleted Vaccinia Virus Copenhagen Strain against Malignant Pleural Mesothelioma. *Mol. Ther.-Oncolytics* **2020**, *18*, 573–578. [[CrossRef](#)]
 161. Delaunay, T.; Achard, C.; Boisgerault, N.; Grard, M.; Petithomme, T.; Chatelain, C.; Dutoit, S.; Blanquart, C.; Royer, P.-J.; Minvielle, S.; et al. Frequent Homozygous Deletions of Type I Interferon Genes in Pleural Mesothelioma Confer Sensitivity to Oncolytic Measles Virus. *J. Thorac. Oncol.* **2020**, *15*, 827–842. [[CrossRef](#)]
 162. Lemos de Matos, A.; Franco, L.S.; McFadden, G. Oncolytic Viruses and the Immune System: The Dynamic Duo. *Mol. Ther.-Methods Clin. Dev.* **2020**, *17*, 349–358. [[CrossRef](#)]
 163. Andtbacka, R.H.I.; Kaufman, H.L.; Collichio, F.; Amatruda, T.; Senzer, N.; Chesney, J.; Delman, K.A.; Spitler, L.E.; Puzanov, I.; Agarwala, S.S.; et al. Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 2780–2788. [[CrossRef](#)]
 164. Kaid, C.; Madi, R.A.D.S.; Astray, R.; Goulart, E.; Caires-Junior, L.C.; Mitsugi, T.G.; Moreno, A.C.R.; Castro-Amarante, M.F.; Pereira, L.R.; Porchia, B.F.M.M.; et al. Safety, Tumor Reduction, and Clinical Impact of Zika Virus Injection in Dogs with Advanced-Stage Brain Tumors. *Mol. Ther.* **2020**, *28*, 1276–1286. [[CrossRef](#)]
 165. Monel, B.; Compton, A.A.; Bruel, T.; Amraoui, S.; Burlaud-Gaillard, J.; Roy, N.; Guivel-Benhassine, F.; Porrot, F.; Génin, P.; Meertens, L.; et al. Zika Virus Induces Massive Cytoplasmic Vacuolization and Paraptosis-like Death in Infected Cells. *EMBO J.* **2017**, *36*, 1653–1668. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 166. Beys-da-Silva, W.O.; Quincozes-Santos, A.; Tureta, E.F.; Rosa, R.L.; Berger, M.; Bobermin, L.D.; Souza, D.O.; Guimarães, J.A.; Santi, L. Association between Zika Virus and Future Neurological Diseases. *J. Neurol. Sci.* **2020**, *409*, 116617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Titre: Rôles des cellules myéloïdes du microenvironnement tumoral lors d'une infection par le virus oncolytique de la rougeole

Mots clés : immunothérapie oncolytique, virus de la rougeole, microenvironnement tumoral, mésothéliome pleural malin, interféron de type I

Résumé :

Toutes les cellules nucléées peuvent détecter, limiter et signaler les infections virales à leur cellules voisines et au système immunitaire grâce à la sécrétion d'interférons de type I (IFN). Le virus atténué de la rougeole (MV) se réplique préférentiellement dans les cellules tumorales du mésothéliome pleural malin (MPM) plutôt que dans les cellules saines car elles présentent souvent des défauts dans cette voie. Cependant, les cellules non tumorales du microenvironnement possèdent des voies antivirales fonctionnelles et peuvent produire de l'IFN en cas d'infection. Dans cette étude, nous avons cherché à déterminer le rôle des cellules myéloïdes dérivées de monocytes, sur l'activité oncolytique du MV et leur contribution à l'immunité anti-tumorale.

Nous avons cultivé des cellules tumorales de MPM avec des monocytes préalablement différenciés, ou non, en macrophages ou en cellules dendritiques. Ces cellules cocultivées ont ensuite été infectées avec le MV. Nos résultats montrent que les cellules dérivées de monocytes peuvent limiter l'action oncolytique du MV de manière spécifique au patient. Par leur production d'IFN, ces cellules compensent l'absence d'expression d'IFN par les cellules tumorales et les protègent contre l'action oncolytique du MV. Toutefois, en réponse au virus, ces cellules myéloïdes génèrent également une réponse inflammatoire, qui pourrait stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale du patient. En conclusion, cette étude souligne l'importance de prendre en compte les cellules non tumorales lors de l'évaluation de l'activité oncolytique du MV.

Title : Roles of myeloid cells in the tumor microenvironment during oncolytic measles virus infection

Keywords : Immunotherapy, measles virus, tumor microenvironment, malignant pleural mesothelioma, type I interferon

Abstract:

All nucleated cells can detect, signal and limit viral infections to their neighboring cells and to the immune system through the secretion of type I interferons (IFN). Attenuated measles virus (MV) replicates preferentially in tumor cells of malignant pleural mesothelioma (MPM) rather than in healthy cells, as they often have defects in this pathway. However, non-tumoral cells in the microenvironment possess functional antiviral pathways and can produce IFN upon infection. In this study, we aimed to determine the role of monocyte-derived myeloid cells on MV oncolytic activity and their contribution to anti-tumor immunity.

We cultured MPM tumor cells with monocytes previously differentiated, or not, into macrophages or dendritic cells. These co-cultured cells were then infected with MV. Our results show that monocyte-derived cells can limit the oncolytic action of MV in a patient-specific manner. By producing IFN, these cells compensate for the lack of IFN expression by tumor cells, protecting them from the oncolytic action of MV. However, in response to the virus, these myeloid cells also generate an inflammatory response, which could stimulate the patient's antitumor immune response. In conclusion, this study highlights the importance of taking non-tumor cells into account when assessing the oncolytic activity of MV.