

Mémoire

Auteur : Kuppens, Amandine

Promoteur(s) : Sadzot, Catherine

Faculté : Faculté des Sciences

Diplôme : Master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire, à finalité approfondie

Année académique : 2021-2022

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/16554>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.



Université de Liège

Faculté des Sciences - Département des Sciences de la Vie

**OPTIMISATION D'UN TRAITEMENT COMBINÉ
BASÉ SUR UN OHSV ARMÉ POUR LA THÉRAPIE
DU GLIOBLASTOME**

Amandine Kuppens

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Master en Biochimie
et Biologie Moléculaire et Cellulaire, à finalité approfondie

Septembre 2022

Laboratoire de Virologie et d'Immunologie, GIGA

Promotrice : Professeur Catherine Sadzot

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont naturellement d'abord à ma promotrice, le Professeur Catherine Sadzot. Je la remercie particulièrement pour sa disponibilité, ses conseils et ses encouragements tout au long de mes recherches et de ma rédaction.

Je remercie ensuite les membres de mon jury, mesdames Ingrid Struman, Marielle Lebrun et Virginie Neirinckx, pour l'attention qu'elles porteront au présent travail.

Je remercie également mon encadrant Maxime Dubois pour avoir pris le temps de me transmettre ses connaissances aussi bien théoriques que concernant les techniques utilisées au laboratoire. Merci aussi à Cédric Lassence pour son aide et sa bonne humeur quotidienne.

Bien sûr, j'adresse aussi mes remerciements aux laboratoires PSI et d'immunométabolisme grâce à qui j'ai passé beaucoup de bons moments, aussi bien au travail qu'en dehors. J'adresse un merci particulier à Chloé Wilkin pour son aide en cytométrie en flux.

Je ne peux terminer ces remerciements sans mentionner mes amis. Avec une pensée particulière pour Eva et Florine dont le soutien a été sans faille durant ces derniers mois, ainsi que pour Margaux.

Merci aussi à ma famille et à Hugo pour tous leurs mots et gestes encourageants pendant ces cinq années d'études.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS **I**

I. INTRODUCTION **1**

1	LE GLIOBASTOME	1
1.1	GÉNÉRALITÉS	1
1.2	DIAGNOSTIC ET TRAITEMENTS	2
2	LES VIRUS ONCOLYTIQUES	4
2.1	DESCRIPTION	4
2.2	LES VIRUS DE L'HERPÈS SIMPLEX ONCOLYTIQUES (OHSV)	4
2.2.1	Généralités sur HSV-1	4
2.2.2	Un virus de l'herpès simplex oncolytique	8
2.2.3	Modifications du génome pour la création d'un HSV oncolytique	8
2.2.4	Armement de l'oHSV avec sTRAIL	11
3	L' APOPTOSE	12
3.1	GENERALITES	12
3.2	LA VOIE INTRINSÈQUE	14
3.3	LA VOIE EXTRINSÈQUE	15
3.4	LES BH3-MIMETIQUES COMME INDUCTEURS DE L' APOPTOSE	17

II. OBJECTIFS **19**

III. MATÉRIELS **20**

1	LIGNÉES CELLULAIRES	20
1.1	CELLULES ADHÉRENTES	20
1.1.1	Cellules VERO	20
1.1.2	GB138	20
1.1.3	U87	20
1.2	CELLULES CULTIVÉES EN TUMOROSPHÈRES	20
2	MILIEUX DE CULTURE	20
2.1	CULTURE DE CELLULES ADHÉRENTES	20
2.2	CULTURE DE TUMOROSPHÈRES	21

2.3	PRODUCTION DE VIRUS	21
3	TAMPONS	21
3.1	PBS	21
3.2	TAMPON DE LYSE RIPA	21
3.3	TBS-TWEEN	21
3.4	TAMPON DE CHARGEMENT	21
3.5	TAMPON DE MIGRATION	22
3.6	TAMPON DE TRANSFERT	22
4	GELS DE POLYACRYLAMIDE	22
5	LISTE DES ANTICORPS	22

IV. MÉTHODES **23**

1	PRODUCTION DE PARTICULES VIRALES PURIFIÉES PAR ULTRACENTRIFUGATION	23
2	TITRATION VIRALE	23
3	TEST DE VIABILITÉ	24
4	TEST DE CYTOTOXICITÉ	25
5	ISOLATION DE MITOCHONDRIES	25
6	WESTERN BLOT	25
6.1	EXTRACTION ET DOSAGE PROTÉIQUE	25
6.2	MIGRATION ET TRANSFERT	26
6.3	MARQUAGE AVEC LES ANTICORPS	26
6.4	RÉVÉLATION	27
7	MESURE DE L' APOPTOSE PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX	27
8	QUANTIFICATION DE S'TRAIL PAR ELISA	28
9	ANALYSES STATISTIQUES	28

V. RÉSULTATS **29**

1	RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES	29
2	COMPARAISON DE OHSV-WT PN-S'TRAIL ET OHSV-WT pCMV-S'TRAIL	31
2.1	PRODUCTION DE S'TRAIL	31
2.2	INDUCTION DE L' APOPTOSE SUR UNE LIGNÉE DE CELLULES DE GBM	32
3	INDUCTION DE L' APOPTOSE DANS DES CELLULES PRIMAIRES DE GBM PAR OHSV-WT pCMV-S'TRAIL	35

3.1	DANS LES CELLULES T033	35
3.2	DANS LES CELLULES GB138	35
4	EFFICACITÉ DE L'ABT-737	37
4.1	ÉTUDE DE L'IMPACT DE L'ABT-737 AU COURS DU TEMPS	37
4.1.1	Comparaison de la viabilité et de la cytotoxicité	37
4.1.2	Étude de la viabilité	38
4.2	INDUCTION DE L'APOPTOSE	39
4.3	COMPARAISON DE LA SENSIBILITÉ DES DIFFÉRENTES CELLULES PRIMAIRES DE GBM	39
5	INDUCTION DES DEUX VOIES DE L'APOPTOSE	41
6	SYNERGIE ENTRE LES DEUX VOIES DE L'APOPTOSE	44

VI. DISCUSSION **46**

1	EFFICACITÉ D'UN OHSV ARMÉ AVEC STRAIL SOUS LE CONTRÔLE DE PCMV	46
1.1	PRODUCTION DU TRANSGÈNE	46
1.2	INDUCTION DE L'APOPTOSE DANS UNE LIGNÉE DE GBM	47
1.3	INDUCTION DE L'APOPTOSE DANS DES CELLULES PRIMAIRES DE GBM	48
2	IMPACT DE L'ACTIVATION DE LA VOIE INTRINSÈQUE DE L'APOPTOSE	49
3	TRAITEMENTS COMBINÉS : UNE POTENTIELLE SYNERGIE	51
4	PERSPECTIVES	54

RÉFÉRENCES **I**

ANNEXES **XII**

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A = Annexine

ADN = Acide Désoxyribonucléique

APS = Persulfate d'ammonium

ATP = Adénosine Triphosphate

Bcl-2 = *B cell lymphoma-2*

BH = *Bcl-2 Homology*

CMV = Cytomégalovirus

CSC = *Cancer Stem Cell*

Da = Dalton

D = DAPI

DMEM = Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO = Diméthylsulfoxyde

E = *Early*

ECL = Electro Chémiluminescence

ELISA = *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

FBS = Sérum Foetal de Bovin

FDA = *Food and Drug Administration*

GBM = Glioblastome

GFP = *Green Fluorescent Protein*

GIC = *Glioblastoma Initiating Cell*

GSC = *Glioblastoma Stem-like Cell*

HG = *High Glucose*

HSV = Virus de l'Herpès Simplex

HVEM = *Herpes Virus Entry Mediator*

IAP = *Inhibitor of Apoptosis*

IC₅₀ = Concentration inhibitrice médiane

IDH = Isocitrate Déshydrogénase

IE = *Immediate Early*

L = *Late*

LDH = Lactate Déshydrogénase

MOI = *Multiplicity Of Infection*

NDP = Nucléoside Diphosphate

oHSV = Virus de l'Herpès Simplex oncolytique

OMS = Organisation Mondiale de la Santé

PBS = *Phosphate Buffered Saline*

PE = Phycoérythrine

RR = Ribonucléotide Réductase

SDS = Dodécysulfate de Sodium

Smac = *Second mitochondria-derived activator of caspase*

SNC = Système Nerveux Central

sTRAIL = forme soluble de TRAIL

TBS-T = *Tris Buffered Saline-Tween*

TMZ = Témazolomide

TNF = *Tumor Necrosis Factor*

TR = Tampon Réducteur

TRAIL = *TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*

WB = Western Blot

ZSV = Zone Sous-Ventriculaire

I. INTRODUCTION

1 LE GLIOBASTOME

1.1 GÉNÉRALITÉS

Les gliomes désignent l'ensemble des tumeurs qui se développent à partir de cellules gliales. Auparavant, ceux-ci étaient divisés en sous-catégories selon des critères histopathologiques. Plus récemment, dans la cinquième version de la classification des tumeurs du système nerveux central (SNC) réalisée par l'OMS, les gliomes ont été divisés en trois catégories selon des critères histologiques, moléculaires et génétiques (Figure 1). Ainsi, les gliomes comprennent les astrocytomes, les oligodendrogliomes et les glioblastomes (GBM) [1]. Parmi ces trois derniers, le glioblastome est le plus courant et le plus agressif. Il est associé à un grade 4, indiquant qu'il s'agit d'une tumeur hautement maligne conduisant rapidement à la mort si aucun traitement n'est suivi [1]. Le pronostic vital des patients, majoritairement âgés de 75 à 84 ans, est d'ailleurs généralement très mauvais [2]. L'espérance de vie médiane est estimée à 15 mois après le diagnostic, et seulement 3 mois si aucun traitement n'est suivi [3][4]. Les facteurs de risque, autres que l'âge, restent peu connus. Actuellement, seules les radiations ionisantes ont montré un réel impact sur le développement du GBM [2][3].

D'un point de vue tissulaire, le GBM se distingue des gliomes de bas grade par une activité mitotique élevée, une prolifération vasculaire importante et la présence de régions nécrotiques [2][5][6]. Le microenvironnement tumoral est qualifié de « froid » ou « immunosuppresseur », indiquant une faible infiltration de cellules immunitaires au site de la tumeur [7]. Le GBM est également défini comme « *IDH-wildtype* », contrairement aux autres gliomes dans lesquels l'isocitrate déshydrogénase (IDH), enzyme clé du cycle de Krebs, est mutée [1][8].

Dans la majorité des cas, le GBM est une tumeur primaire, c'est-à-dire qu'elle se développe *de novo* sans précurseur tumoral connu [3][9]. Son origine reste à ce jour controversée : (i) la théorie de dédifférenciation postule que la perte de suppresseurs de tumeur et l'activation d'oncogènes entraînent l'initiation du GBM à partir d'astrocytes, (ii) la théorie des cellules souches suggère que la tumeur se développe à partir de cellules souches neurales et de progéniteurs [10]. Ces dernières ont la capacité, dans des expériences de xénotransplantes, de s'auto-renouveler et de former des tumeurs secondaires. On parle alors de cellules souches cancéreuses (CSCs, *Cancer Stem Cells*) ou, dans le cas du glioblastome, de cellules souches de GBM (GSCs, *Glioblastoma Stem-like Cells*) [2][11].

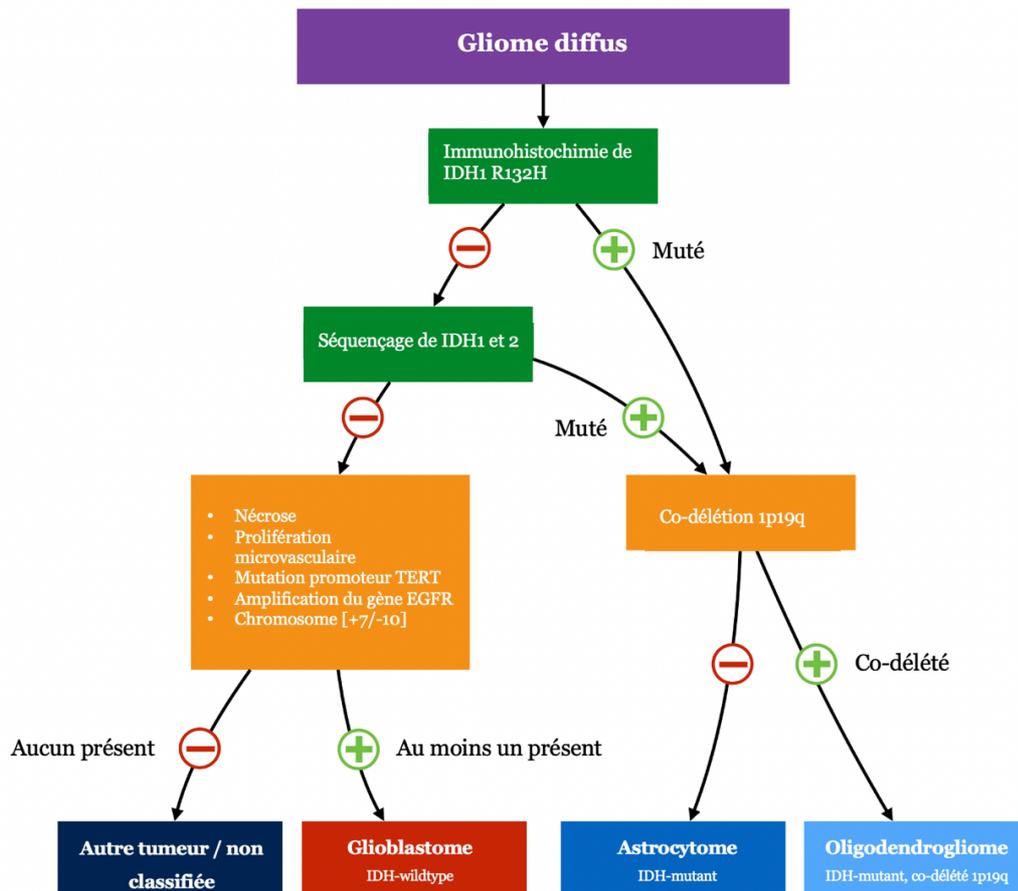


Figure 1. Classification des gliomes diffus. Clé dichotomique basée sur la cinquième édition de la classification des tumeurs du CNS selon l'OMS. Image adaptée Gaillard & Yap, 2022.

1.2 DIAGNOSTIC ET TRAITEMENTS

Le diagnostic du GBM démarre généralement avec un examen neurologique, suivi par des tests d'imagerie médicale (IRM, tomographie) pour déterminer la taille et la localisation de la tumeur. Des analyses histopathologiques sont ensuite réalisées à partir de biopsies afin d'établir le type de tumeur ainsi que d'évaluer son agressivité [6].

Actuellement, le traitement standard du GBM est multimodal. Il repose sur une résection maximale de la masse tumorale, suivie par une combinaison de radio- et de chimiothérapie avec du témozolomide (TMZ), un agent alkylant qui induit l'apoptose des cellules en division [12]. En dépit de ces traitements, le pronostic des patients reste extrêmement mauvais, avec seulement 2% de survie au-delà de 5 ans pour les patients âgés de plus de 65 ans [2].

Plusieurs facteurs modulent l'efficacité des thérapies classiques. D'abord, l'efficacité variable d'un traitement au TMZ pour les patients de GBM s'explique par des facteurs génétiques, c'est notamment le cas selon le statut de méthylation de la O6-guanine ADN méthyltransférase (MGMT) impliquée dans la réparation de l'ADN. Lorsque le promoteur de

celle-ci est méthylé, l'enzyme est désactivée et l'efficacité du TMZ est maximale [13]. La barrière hémato-encéphalique, dont le rôle est de maintenir l'homéostasie du cerveau, constitue un autre frein à la distribution de beaucoup de médicaments dans celui-ci. Seules les molécules liposolubles de petite taille (< 400 Da) peuvent la traverser [14][15][16].

La mortalité importante associée au GBM en dépit de ces traitements est la conséquence d'une récurrence quasiment systématique de la tumeur. Cette dernière résulte d'une résection incomplète de la masse tumorale en raison de son aspect diffus ainsi que de la résistance de certaines cellules aux thérapies classiques, notamment les GSCs. Ces cellules jouent d'ailleurs un rôle particulièrement important dans la résurgence du GBM. Bien que majoritairement présentes au site de la tumeur, celles-ci ont la capacité de migrer vers la zone sous-ventriculaire (ZSV), une région située près des ventricules latéraux et définie comme une niche neurale de cellules souches (Figure 2) [17]. La migration des GSCs à travers le corps calleux pour rejoindre la ZSV les rend inaccessibles pour la résection chirurgicale et leur confère une résistance accrue aux traitements classiques [11][18].

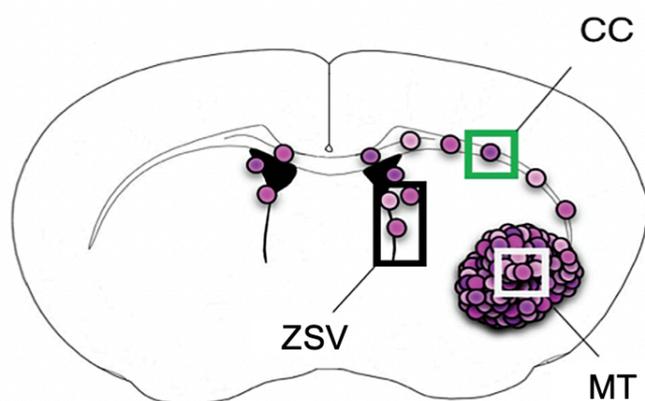


Figure 2. Migration des GSCs à partir de la masse tumorale (MT) vers la zone sous-ventriculaire (ZSV) en passant par le corps calleux (CC). Figure adaptée de [18].

Dans le but de contourner cette résistance et d'améliorer la survie des patients, d'autres méthodes de traitements sont activement recherchées. Parmi les nouvelles stratégies thérapeutiques encourageantes, on compte l'immunothérapie, l'utilisation de petites molécules inhibitrices, la thérapie par les cellules souches, l'édition de génome par CRISPR/Cas9 ou encore la virothérapie, c'est-à-dire l'utilisation de virus oncolytiques [12][14]. Étant donné l'implication des GSCs dans la résistance aux traitements et la résurgence de la tumeur, ces cellules représentent une cible de choix pour améliorer la survie des patients de GBM [19].

2 LES VIRUS ONCOLYTIQUES

2.1 DESCRIPTION

Un virus oncolytique peut être défini comme un virus ayant la capacité d'intégrer, de se répliquer et de causer la lyse spécifiquement dans des cellules tumorales, tout en épargnant le tissu sain [20].

Outre leur action lytique sur les cellules infectées, les virus oncolytiques ont également un effet indirect majeur permettant de stimuler la réponse immunitaire antitumorale chez l'hôte [21][22]. En effet, la libération d'antigènes à la fois viraux et tumoraux dans le milieu extracellulaire provoque le recrutement de cellules des réponses innée et adaptative au site de la tumeur (e.g. macrophages, lymphocytes T), indiquant un shift d'un microenvironnement tumoral *froid* vers un *chaud* [23]. Ce passage d'un microenvironnement *froid* vers *chaud* permet de réduire l'évasion de la tumeur face au système immunitaire, cette dernière étant l'une des caractéristiques du cancer. On observe notamment une polarisation des macrophages, cellules immunitaires de la réponse innée, d'un phénotype immunosuppresseur (M2) vers un profil pro-inflammatoire (M1). Ces macrophages de type M1 sont capables d'activer à leur tour une réponse immunitaire adaptative antitumorale [24]. Généralement, l'efficacité des virus oncolytiques est augmentée par un armement permettant l'expression d'un transgène visant à détruire les cellules infectées mais également à exprimer des agents thérapeutiques directement au site de la tumeur, par exemple des cytokines pro-inflammatoires [25].

Parmi toutes les recherches sur les virus oncolytiques, celles sur les virus oncolytiques de l'herpès simplex, notés oHSV, sont les plus avancées à ce jour. Le T-VEC (Talimogene Laherparepvec), un virus de l'herpès simplex de type 1 modifié pour se répliquer spécifiquement dans les cellules tumorales, a été le premier virus oncolytique approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) dès 2015 pour le traitement des mélanomes [26][22]. Depuis lors, d'autres traitements basés sur oHSV ont montré leur efficacité contre plusieurs types de cancers, y compris le GBM. Certains d'entre eux, notamment G17 Δ , M032 ou rQNestin34.5v.2, sont actuellement en phases préclinique et clinique [22][27].

2.2 LES VIRUS DE L'HERPÈS SIMPLEX ONCOLYTIQUES (OHSV)

2.2.1 GÉNÉRALITÉS SUR HSV-1

Le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) fait partie de la famille des Herpesviridae dont les membres sont caractérisés par la structure suivante : un génome linéaire d'ADN

double brin entouré d'une nucléocapside icosaédrique, une enveloppe formée d'une bicouche lipidique dans laquelle sont ancrées des glycoprotéines et un espace riche en protéines compris entre la capside et l'enveloppe appelé le tégument [28]. À l'instar des autres membres de la sous-famille des alpha-herpesvirinae infectant l'homme, c'est-à-dire le virus de la varicelle et du zona (VZV) et l'herpès simplex de type 2 (HSV-2), le cycle infectieux de l'HSV-1 présente les caractéristiques suivantes : il se réplique rapidement, son cycle lytique est relativement court et le virus peut rester sous forme latente, principalement dans des ganglions sensoriels.

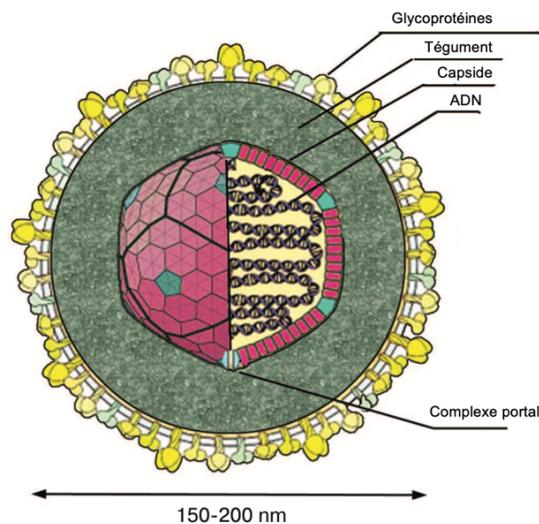


Figure 3. Représentation schématique de la structure de HSV-1. Le génome viral composé d'ADN double brin est protégé par une nucléocapside icosaédrique. La particule virale est entourée d'une enveloppe lipidique dans laquelle sont ancrées des glycoprotéines. Le tégument, riche en protéines, sépare la capside de la bicouche lipidique. Image adaptée à partir de [28].

Le génome d'HSV-1 est long de 152 kpb et code pour 74 protéines différentes. Il comprend deux régions uniques longue et courte (respectivement U_L et U_S), autour desquelles se trouvent des séquences inversées et hautement répétées (TR_L/IR_L , TR_S/IR_S) [22]. Les origines de réplication, ORI_S et ORI_L , se trouvent dans les régions courtes répétées (IR_S/TR_S) et dans la région unique longue (U_L) [29].

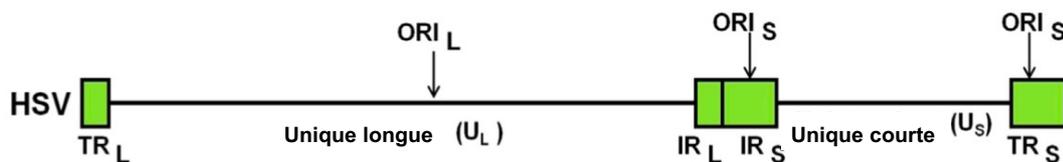


Figure 4. Structure du génome du virus de l'herpès simplex. HSV possède un génome de 152 kpb contenant deux régions uniques (U_L et U_S) et des séquences répétées (TR_L/IR_L et TR_S/IR_S). Les origines de réplication ORI_S et ORI_L sont également indiquées. Image adaptée à partir de [29].

L'infection par HSV-1 se transmet par contact des muqueuses buccales et se manifeste par un herpès labial (ou plus rarement de l'herpès génital). Bien que l'infection soit asymptomatique la plupart du temps, elle peut dans certains cas être à l'origine de lésions incommodes. Certaines manifestations, bien que rares, sont plus sévères et peuvent donner lieu à des encéphalites, parfois mortelles [30].

À la fois nucléaire et cytoplasmique, le cycle infectieux d'HSV-1 est relativement complexe (Figure 5). L'entrée du virus dans la cellule hôte est médiée par l'interaction entre des glycoprotéines virales de l'enveloppe et des récepteurs membranaires localisés sur la cellule hôte. Parmi les douze glycoprotéines de l'enveloppe d'HSV-1, cinq participent activement à l'entrée du virus : gB, gC, gD, gH et gL. Dans un premier temps, gB et gC interagissent avec des glycosaminoglycans, principalement l'héparan sulfate, localisés en surface de tous les types cellulaires. Ensuite, une seconde interaction plus spécifique se met en place entre la glycoprotéine D et l'un des récepteurs membranaires spécifiques. Les principaux récepteurs d'HSV-1 sont la nectine, HVEM (*Herpes Virus Entry Mediator*) et l'héparan sulfate 3-O-sulfaté (3-O-S-HS) [31]. Une fois cette interaction mise en place, gD subit un changement de conformation qui lui permet de se lier à un hétérodimère de gH/gL et d'enclencher la fusion de l'enveloppe avec la membrane plasmique, suivie par la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme [30]. Dans la cellule, la capsid est prise en charge par le cytosquelette, majoritairement par les microtubules, et est acheminée vers le noyau grâce aux protéines moteurs dynéines et kinésines, où le génome viral se circularise pour être transcrit et répliqué.

La transcription des gènes encodés dans le génome viral a lieu de manière séquentielle et est réalisée par l'ARN polymérase II cellulaire [28]. Elle commence par l'expression des gènes *immediate early* (IE), codant essentiellement pour des facteurs de transcription activant l'expression des gènes de la phase suivante. La protéine ICP4 fait par exemple partie des cinq protéines virales exprimées pendant la phase IE, elle permet d'augmenter la vitesse de transcription des gènes viraux en facilitant le recrutement de facteurs de transcription cellulaires [32]. Les protéines encodées par les gènes *early* (E), transcrits ensuite sous le contrôle des protéines IE, comprennent principalement des enzymes impliquées dans le métabolisme des acides nucléiques. À l'issue de l'expression des protéines *early*, le génome viral est répliqué par un processus de *rolling circle*, aboutissant à la formation d'un concatémère linéaire. La réplication est réalisée par un ensemble de protéines à la fois cellulaires et virales [28]. Finalement, les gènes de la phase *late* (L) sont transcrits. Ceux-ci codent pour des protéines structurales participant à la formation de la nucléocapside, de

l'enveloppe et du tégument. Les capsomères (penta- et hexamères) constituant la nucléocapside résultent de l'assemblage de protéines VP5. D'autres protéines (VP19C, VP23 et VP26) permettent la connexion entre celles-ci [33]. L'empaquetage de l'ADN viral dans la nucléocapside est réalisé via le *portal complex*, composé de douze copies de la protéine virale pUL6 [33]. Lors de son passage dans ce complexe, le concatémère est clivé de manière à n'empaqueter qu'une copie du génome viral. Enfin, la capside sort du noyau en bourgeonnant au niveau de sa membrane interne, induisant son enveloppement primaire. Le virion fusionne ensuite avec la membrane externe pour rejoindre le cytoplasme. Il acquiert finalement son enveloppe définitive par bourgeonnement au niveau de l'appareil de Golgi [30]. Les nouveaux virions sont relargués dans le milieu extracellulaire par exocytose.

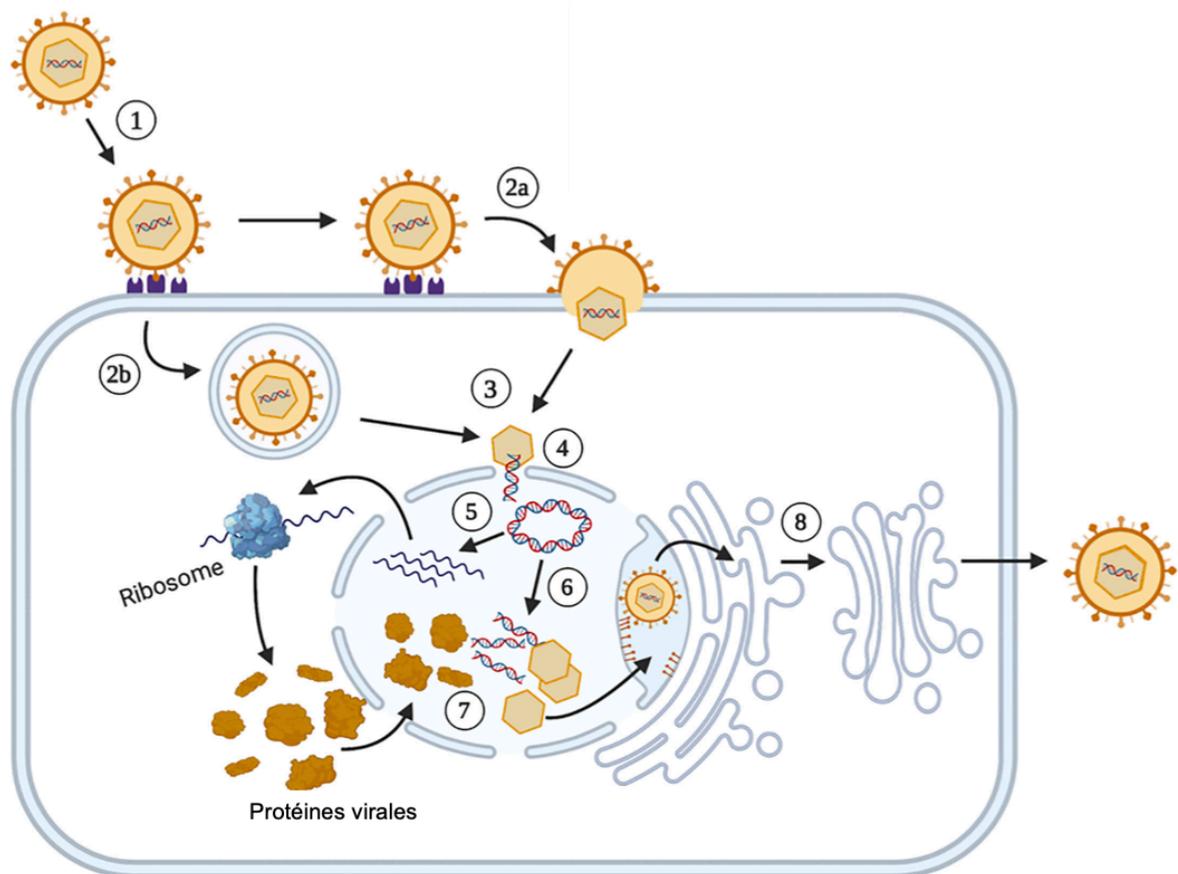


Figure 5. Cycle lytique de HSV-1. 1. Liaison de la particule virale à la cellule hôte par l'intermédiaire de glycoprotéines virales (gB, gC, gD) et de protéines membranaires (héparan sulfate, notamment). 2. Entrée par endocytose (2a) ou formation d'un endosome (2b). 3. Transport de la capside par le cytosquelette. 4. Entrée du génome viral dans le noyau, suivie de sa circularisation. 5. Transcription séquentielle des gènes viraux (Immediate Early, Early et Late), suivie de leur traduction par les ribosomes. 6. Réplication de l'ADN viral par rolling circle. 7. Assemblage de nouveaux virions. 8. Sortie : la capside sort du noyau par bourgeonnement puis transite par le réseau trans-golgien où elle acquiert son enveloppe définitive. Enfin, le virion est relargué dans le milieu extracellulaire par exocytose. Schéma adapté de [34].

2.2.2 UN VIRUS DE L'HERPÈS SIMPLEX ONCOLYTIQUE

Le choix de l'utilisation d'un herpès virus pour le traitement du glioblastome comporte de nombreux avantages [22]. Tout d'abord, son génome est long et contient des régions non essentielles, ce qui le rend particulièrement adapté pour y apporter des modifications. Ensuite, l'utilisation d'HSV est intéressante pour son cycle cellulaire rapide et cytolytique [28]. Enfin, son utilisation est sûre car nous disposons de plusieurs antiviraux, par exemple l'acyclovir (un analogue de nucléoside), permettant de stopper l'infection en cas de réplication excessive *in vivo*, notamment si l'infection s'est étendue à des tissus sains [28].

2.2.3 MODIFICATIONS DU GÉNOME POUR LA CRÉATION D'UN HSV ONCOLYTIQUE

La sécurité d'un traitement du glioblastome avec un Herpès Simplex Virus oncolytique (oHSV) repose sur son atténuation par une série de mutations. Ceci permet de diminuer sa virulence et d'assurer la réplication virale uniquement dans les cellules cancéreuses [21].

Durant ce mémoire, les virus utilisés comportent trois types de délétions (Δ ICP34.5, Δ ICP6 et Δ ICP47) dont les rôles sont définis ci-dessous (Figure 6). Les modifications ont été réalisées par clonage du génome d'HSV-1 et son intégration dans un chromosome artificiel bactérien (BAC), méthode efficace pour l'intégration de matériel génétique exogène par recombinaison homologue [35].

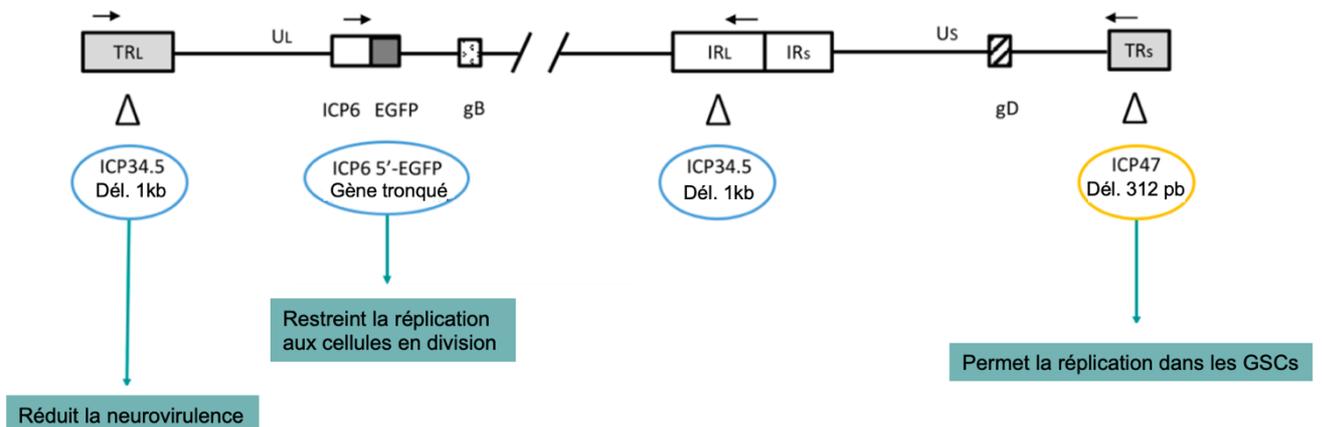


Figure 6. Modifications du génome d'HSV-1 pour créer un oHSV ciblant les cellules de glioblastome. Schéma réalisé par Judit Sanchez Gil, PhD.

Les fonctions de chacune des trois délétions réalisées dans le génome d'HSV-1 sont détaillées dans les paragraphes suivants.

A. Δ ICP34.5

Une délétion des deux copies du gène γ 34.5 du facteur de neurovirulence ICP34.5 a été réalisée afin de restreindre la réplication virale aux cellules tumorales (Figure 7). Durant une infection par HSV-1, la cellule enclenche un mécanisme de protection menant à un arrêt de la synthèse de protéines, dans le but de contrer la réplication du virus. Ceci résulte du recrutement de la protéine kinase R (PKR) qui phosphoryle et inactive des facteurs d'initiation de la transcription cellulaire (e.g. eIF-2 α) [36]. La protéine virale ICP34.5, quant à elle, permet de contourner ce mécanisme de défense et de rétablir la synthèse protéique. Ainsi, puisque ICP34.5 permet la réplication virale dans les neurones, sa délétion conditionne cette réplication aux cellules tumorales n'exprimant que faiblement PKR [21].

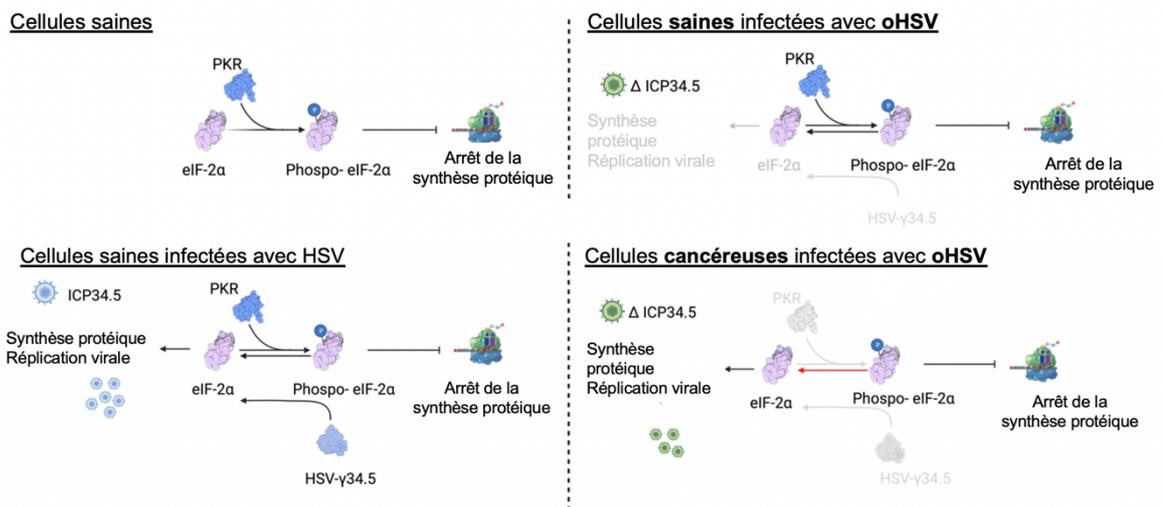


Figure 7. Impact de la délétion Δ ICP34.5 chez oHSV. Adapté à partir de [37].

B. Δ ICP6

Cette deuxième mutation a quant à elle comme objectif de restreindre la réplication d'oHSV aux cellules en division (Figure 8). ICP6, encodé par le gène *UL39*, est la grande sous-unité de la ribonucléotidase (RR) virale impliquée dans la transformation de ribonucléotides (NDPs) en désoxyribonucléotides (dNDPs), étape essentielle pour la réplication de l'ADN viral. Dans les cellules ne se divisant pas, la RR cellulaire est inactive. La réplication du virus dans celles-ci repose par conséquent uniquement sur l'activité de la RR virale. Les cellules en division sont quant à elles caractérisées par une RR cellulaire active, ce qui permet la réplication virale dans celles-ci en l'absence de la protéine ICP6 [21][37].

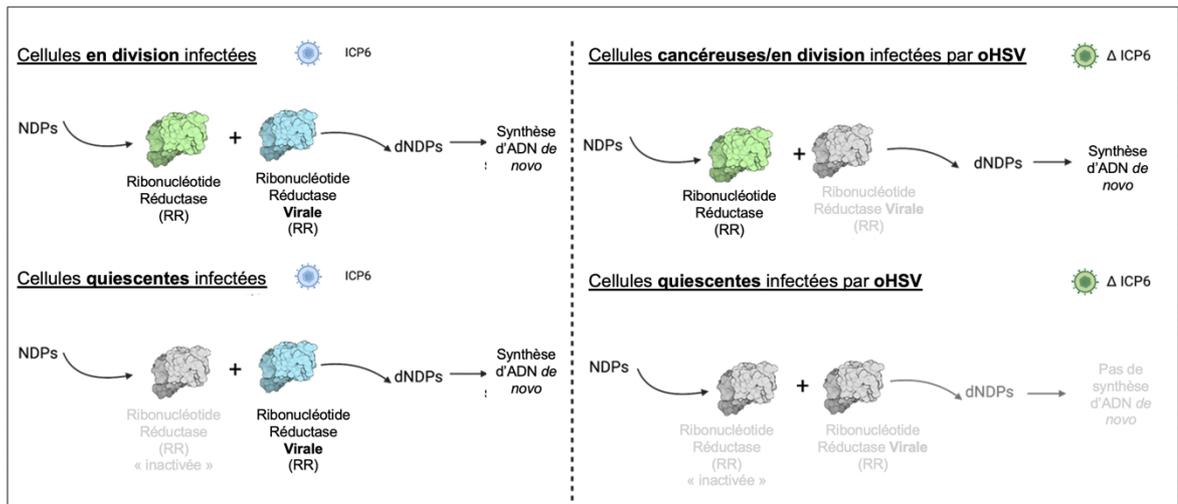


Figure 8. Impact de la délétion Δ ICP6 chez oHSV. Adapté à partir de [37].

C. Δ ICP47

La délétion du gène *Us12* codant pour la protéine ICP47 a deux effets sur la réplication du virus (Figure 9). Tout d'abord, elle permet de restaurer la présentation efficace d'antigènes dans le CMH-I (complexe majeur d'histocompatibilité de type I) en surface des cellules. En effet, lors d'une infection par HSV, la liaison d'ICP47 au transporteur TAP (*Transporter associated with Antigen Processing*) empêche la présentation de peptides dans un contexte de CMH-I et permet donc d'éviter leur reconnaissance par le système immunitaire [38][39]. Δ ICP47 augmente donc la reconnaissance immunitaire antitumorale. Ensuite, cette délétion place le gène *Us11*, gène considéré comme *late*, sous le contrôle du promoteur *immediate early* de *Us12*. Le facteur *Us11*, comme ICP34.5, réprime l'arrêt de la traduction des protéines cellulaires en réponse à l'infection. Placé sous le contrôle d'un promoteur IE, la réplication virale est accélérée [38]. Cet effet restaure la réplication dans les cellules GSCs (ou GICs), fortement diminuée par les mutations Δ ICP34.5 [22][40].

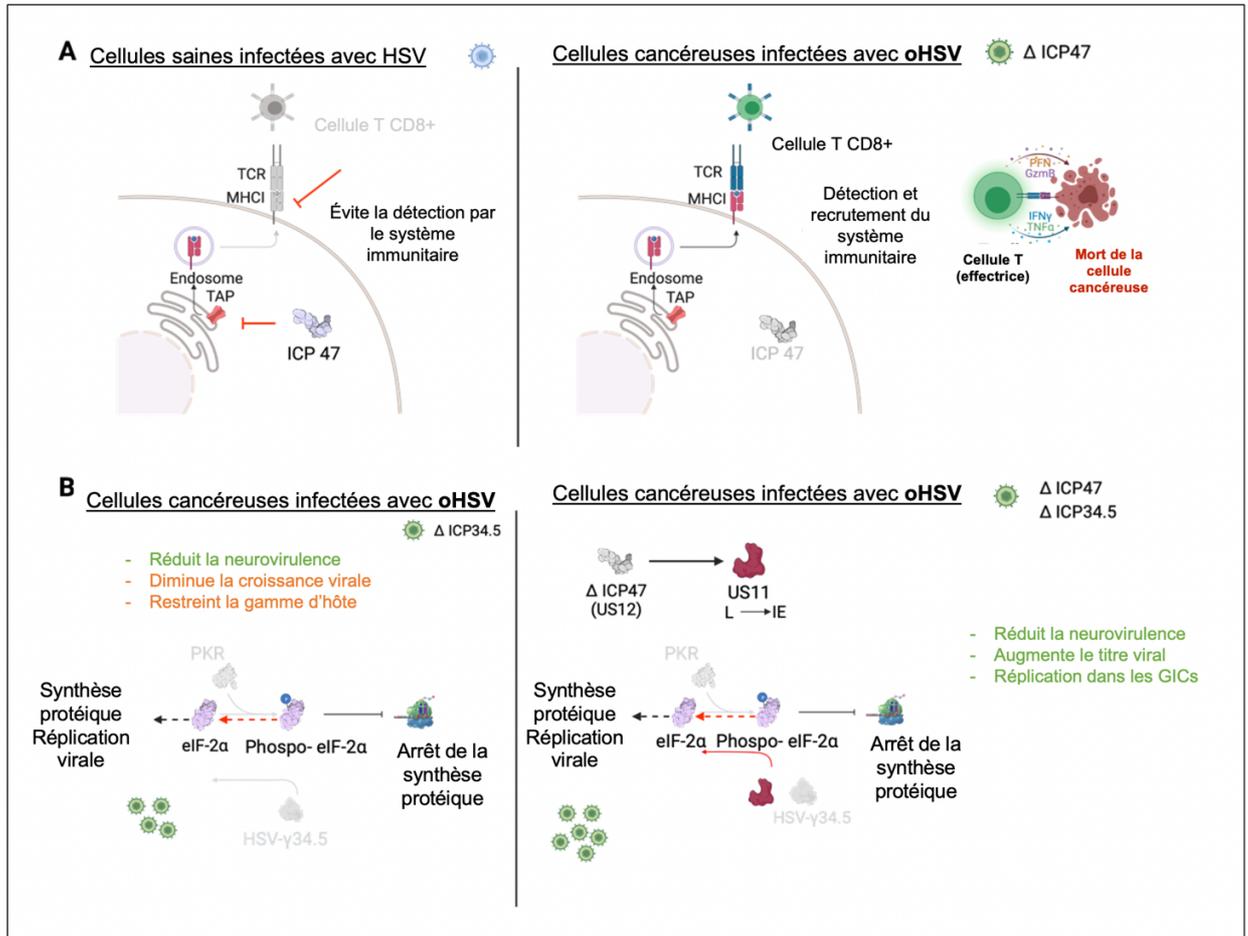


Figure 9. Impacts de la délétion Δ ICP47 chez oHSV. Adapté à partir de [37].

2.2.4 ARMEMENT DE L'OHSV AVEC sTRAIL

Les atténuations décrites dans les paragraphes précédents nous ayant permis d'assurer une réplication du virus sélectivement dans les cellules tumorales, celui-ci a dans un second temps été armé afin d'optimiser la mort cellulaire des cellules infectées et de celles se trouvant à proximité, en induisant l'apoptose de manière autocrine et paracrine. Pour cela, un transgène exprimant la forme soluble de TRAIL (*TNF Related Apoptosis Inducing Ligand*), notée sTRAIL, a été introduit dans le génome viral. Dans un premier temps, la construction réalisée comprenait la partie extracellulaire de TRAIL sous le contrôle d'un promoteur nestine, protéine exprimée dans les cellules progénitrices et dans les cellules tumorales du SNC [41]. Ce virus est appelé **oHSV-WT pN-sTRAIL**.

Bien que l'efficacité d'oHSV-WT pN-sTRAIL à induire l'apoptose ait été démontrée *in vitro* dans certaines lignées cellulaires de GBM [37][42], celle-ci dépend néanmoins de la nestine, exprimée différemment dans les différentes lignées de GBM (Figure 16). Afin

de contourner cette limitation, une nouvelle construction plaçant sTRAIL sous le contrôle du promoteur fort CMV (cytomégalo virus) a été réalisée. Ce second virus, appelé **oHSV-WT pCMV-sTRAIL**, a principalement été utilisé dans ce travail (Figure 10).

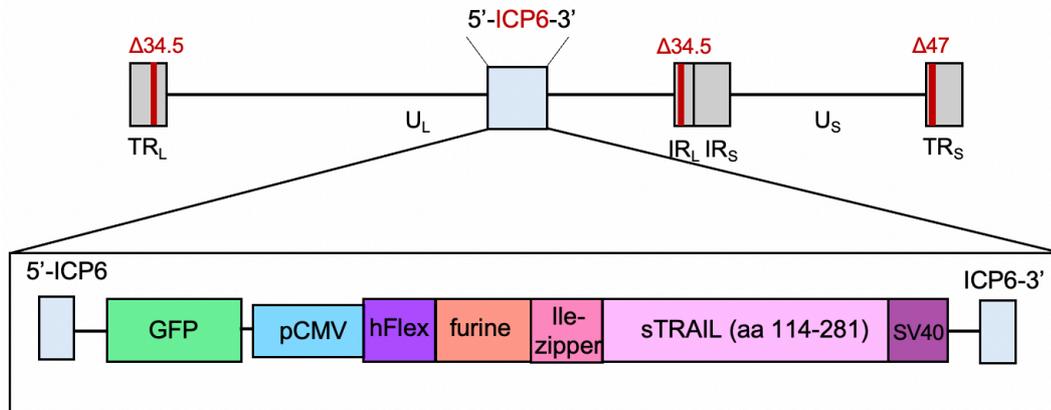


Figure 10. Représentation schématique de oHSV-WT pCMV-sTRAIL. Insertion du gène codant pour la partie extracellulaire de TRAIL (acides aminés 114 à 281) précédée d'une séquence hFlex, d'un peptide furine, d'une glissière à isoleucine (Ile-zipper) et suivie d'une séquence SV40. Cette construction est placée sous le contrôle du promoteur CMV. La GFP est introduite en amont, sous le contrôle du promoteur viral ICP6.

3 L' APOPTOSE

3.1 GENERALITES

L'apoptose est un type de mort cellulaire programmée gouverné par une série de mécanismes moléculaires hautement régulés [43]. Tout comme la mitose, l'apoptose est essentielle au développement et à l'homéostasie de l'ensemble des organismes pluricellulaires sur bien des aspects. Parmi ceux-ci, on compte notamment le développement embryonnaire, le développement du système nerveux et du système immunitaire et le renouvellement des cellules [43]. Une caractéristique importante de l'apoptose est que ce type de mort cellulaire, contrairement à la nécrose, n'entraîne pas de réponse inflammatoire car le contenu du cytoplasme n'est pas relargué dans le milieu extracellulaire. Dans ce cas, la cellule se fragmente en corps apoptotiques et est phagocytée dans son intégralité par des cellules immunitaires spécialisées, particulièrement les macrophages. D'un point de vue morphologique, une cellule apoptotique est caractérisée par la diminution de sa taille, la condensation de la chromatine (pycnose) et la fragmentation du noyau [43][44].

Le processus d'apoptose comprend deux voies majoritaires : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. Celles-ci sont initiées différemment mais convergent vers l'activation des mêmes caspases effectrices [45]. Les caspases sont des protéases à cystéine spécialisées clivant leur substrat préférentiellement après un résidu aspartate [46]. Les membres de cette famille de protéines sont synthétisés sous forme de proenzyme, avec un prodomaine qui comporte une grande (p20) et une petite (p10) sous-unité (Figure 11a) [47]. Leur activation résulte d'une protéolyse au niveau de résidus asparagine (lien Asp-X) dans les sous-unités p20 et p10, suivie de la formation d'un hétérotétramère p20₂-p10₂ (Figure 11b).

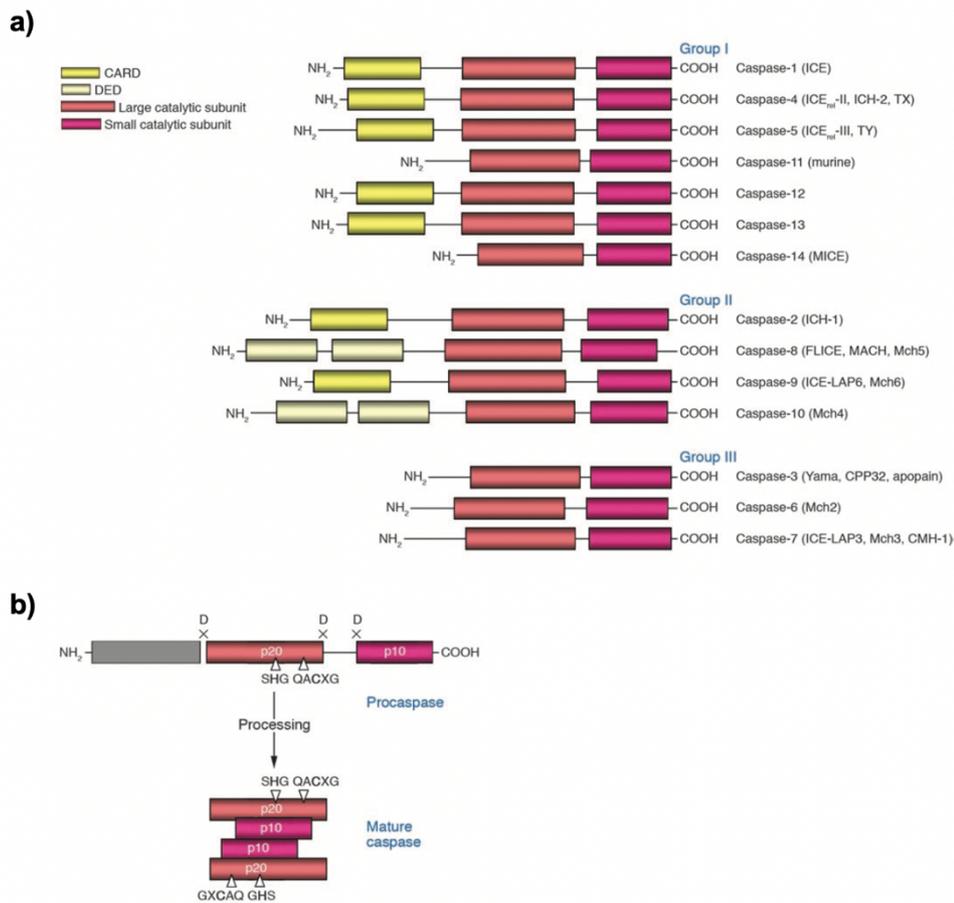


Figure 11. Structure des caspases. a) Famille des caspases. Groupe I : caspases inflammatoires, groupe II : caspases initiatrices, groupe III : caspases effectrices. Les sous-unités CARD (Caspase Recruitment Domain), DED (Death Effector Domain), p20 et p10 sont représentées. b) Activation des caspases. Formation de la caspase mature par clivage de la proenzyme à un domaine Asp-X spécifique. Schéma adapté de [47].

Les perturbations du programme de mort cellulaire, tant en excès qu'en déficit, sont à l'origine de plusieurs pathologies, y compris de nombreux cancers [43][48][49]. En effet, bien que les cellules tumorales soient soumises à un certain nombre de stress constituant des stimuli susceptibles d'enclencher la signalisation de l'apoptose (e.g. altérations génétiques, hypoxie), celles-ci continuent de proliférer. Pour assurer le maintien de la croissance

tumorale, les cellules sont notamment caractérisées par une série de modulations visant à échapper à l'activation de l'apoptose. On peut ainsi fréquemment observer dans des cellules tumorales une augmentation ou une diminution de l'expression des protéines anti- et pro-apoptotiques, respectivement [50]. Pour cette raison, une connaissance approfondie de la signalisation de l'apoptose ainsi que de la fonction des acteurs moléculaires impliqués dans celle-ci constituent un enjeu thérapeutique considérable.

3.2 LA VOIE INTRINSÈQUE

La voie intrinsèque, également appelée voie mitochondriale, est enclenchée par des stimuli variés ne dépendant pas de la liaison d'un ligand à son récepteur : radiation, hypoxie, absence de facteurs de croissance, etc. (Figure 12b) [43]. Suite à cela, une réponse intracellulaire menant la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe est enclenchée [49]. La voie mitochondriale est contrôlée par des protéines de la famille Bcl-2 (*B cell lymphoma 2*), partageant un nombre variable de copies du domaine *Bcl-2 Homology* (BH) hautement conservé [45]. Les protéines de la famille Bcl-2 comprennent à la fois des membres pro- et anti-apoptotiques, dont la balance détermine le destin de la cellule (Figure 12a). Les protéines anti-apoptotiques (e.g. Bcl-2, Bcl-X_L et Mcl-1) présentent jusqu'à quatre domaines BH. Le groupe des protéines pro-apoptotiques, quant à lui, est divisé en deux sous-groupes : (1) les protéines effectrices Bak, Bax et Bok, comptant quatre domaines BH et (2) les protéines initiateuses comprenant notamment Bim, Bad et Bid, ne présentant que le domaine BH3 et dès lors appelées *BH3-only* [45][51].

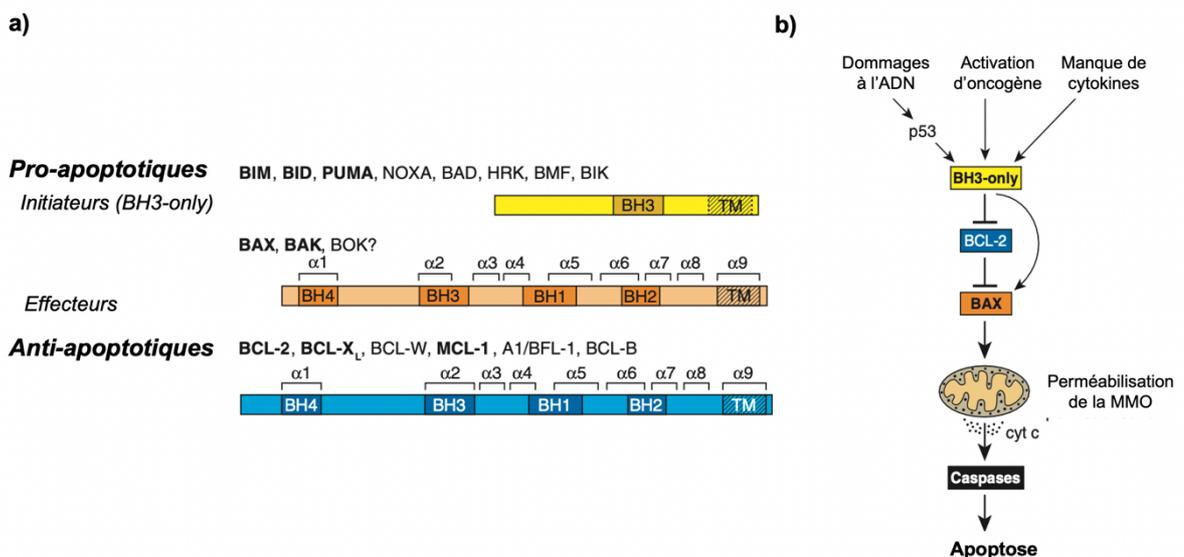


Figure 12. Représentation schématique des membres de la famille protéique Bcl-2 (a) et de leur implication dans la voie mitochondriale de l'apoptose (b). Image adaptée à partir de [51].

Selon le « *modèle de neutralisation* », en conditions normales, l'action des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak est neutralisée par leur liaison aux membres anti-apoptotiques [49]. Lorsqu'un stimulus pro-apoptotique est perçu, l'expression de protéines *BH3-only* est enclenchée. Celles-ci agissent d'une part en inhibant les membres anti-apoptotiques en s'y liant via leur poche hydrophobe et, d'autre part, en activant directement les protéines effectrices Bak et Bax. L'activation de Bax et Bak est suivie de leur ancrage dans la membrane mitochondriale externe, de la formation d'un pore membranaire et de la libération de facteurs pro-apoptotiques tels que Smac/DIABLO et le cytochrome *c* vers le cytoplasme. Finalement, un complexe appelé « apoptosome » se forme par la liaison entre Apaf1 (*Apoptosis-Protease Activating Factor 1*), le cytochrome *c* et la caspase 9 [52]. L'activation de cette dernière active à son tour les caspases 3, 6 et 7 effectrices, marquant le point de convergence avec la voie extrinsèque (Figure 13). Cette seconde voie est également amplifiée par la levée de l'inhibition qu'exercent les protéines IAP (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*), e.g. XIAP (*X-linked IAP*), sur les caspases [43].

3.3 LA VOIE EXTRINSÈQUE

La voie de signalisation extrinsèque de l'apoptose, ou voie ligand-dépendante, est caractérisée par une cascade d'activation de caspases. Elle est initiée par la liaison d'un ligand appartenant à la famille des *Tumor Necrosis Factor* (TNF) à son récepteur de mort (*Death Receptor*, DR) localisé en surface et caractérisé par la présence d'un domaine intracellulaire DD (*Death Domain*) responsable de la transduction du signal apoptotique [53]. Parmi les ligands les mieux décrits, on retrouve TNF, FasL (ligand de Fas) et TRAIL (*TNF Related Apoptosis Inducing Ligand*), majoritairement produits par des cellules immunitaires. Parmi eux, TRAIL est suggéré comme candidat le plus prometteur pour des approches thérapeutiques [54][55].

La liaison de TRAIL à l'un de ses récepteurs pro-apoptotiques DR4 ou DR5 (également appelés TRAIL-R1 et -R2, respectivement) provoque le regroupement de ceux-ci en trimère et la formation du complexe « DISC », pour *Death-Inducing Signaling Complex*. Ce dernier comprend la protéine adaptatrice FADD (*Fas-Associated Death Domain*) et les procaspases 8 et 10 [56]. Le recrutement de la procaspase 8 dans le complexe induit son auto-activation et sa libération. Dans certaines cellules dites de type I, ceci est suffisant pour permettre l'activation des caspases effectrices en aval. Dans d'autres cellules dites de type II, le niveau de caspase 8 (Cas8) est insuffisant et une contribution de la voie mitochondriale est nécessaire

pour mener à l'apoptose. Dans ces dernières, l'activation de Cas8 entraîne le clivage de Bid, membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2, et par conséquent l'activation de la voie mitochondriale pour amplifier le signal apoptotique [54].

L'activation de la Cas8, suivie de sa libération du DISC, lui permet d'activer à son tour les caspases effectrices en aval (Cas3, -6, -7) [53][54]. Les caspases 3 et 7 sont responsables du clivage de PARP-1 (*Poly-ADP Ribose Polymerase 1*), une enzyme nucléaire impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN, ce qui constitue une étape clé de l'apoptose [48][57]. Le clivage de PARP-1 en une partie C-terminale de 85 kDa et une partie N-terminale de 25 kDa provoque son inactivation et aboutit à la mort cellulaire par apoptose [58].

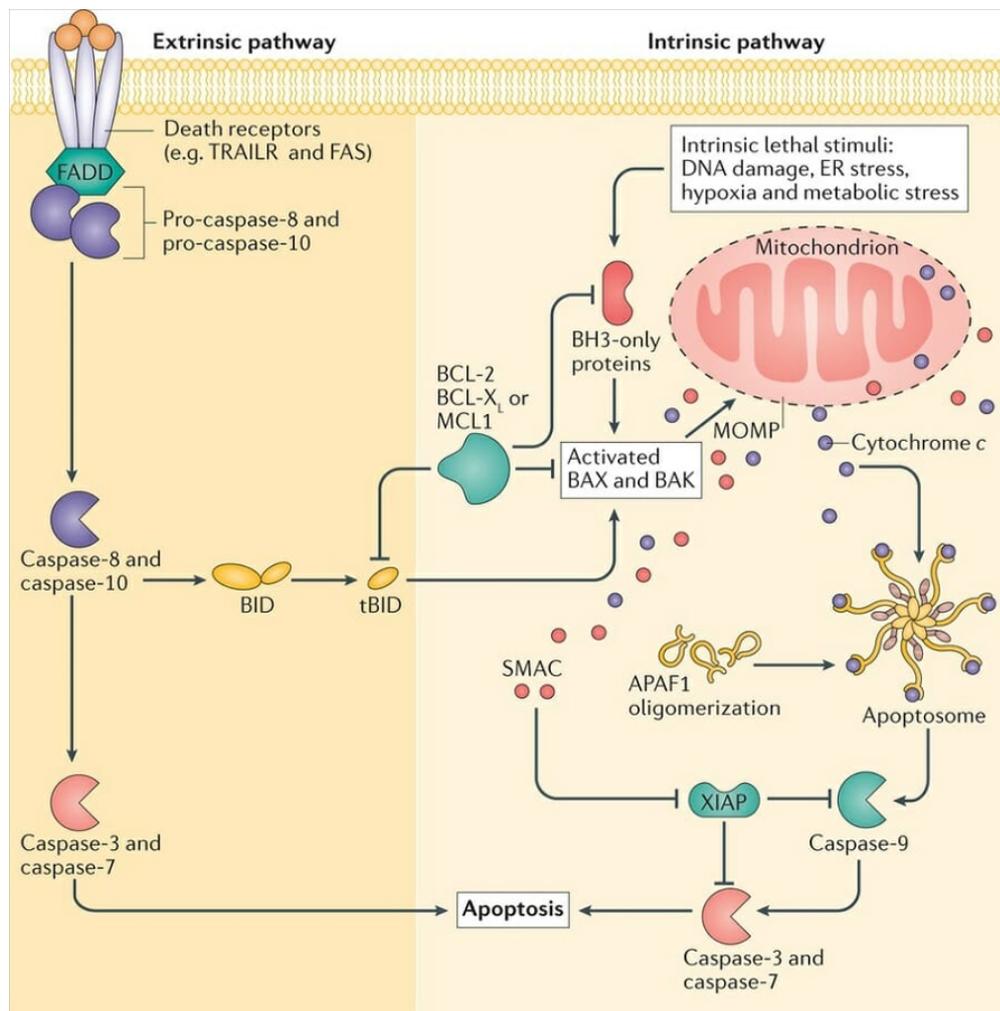


Figure 13. Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose. La liaison du ligand pro-apoptotique (e.g. TRAIL) à l'un de ses récepteurs de mort (TRAIL-R1 et R2) provoque l'oligomérisation de ceux-ci le recrutement des procaspases 8 et 10 à la protéine adaptatrice FADD (Fas Associated Death Domain) pour former le complexe DISC (Death Inducing Signaling Complex). Dans certaines cellules, l'auto-activation de la caspase 8 suffit à l'activation de la cascade des caspases. Dans d'autres, une contribution de la voie mitochondriale, activée par le clivage de Bid, est nécessaire. Cette seconde voie entraîne la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et le relargage des facteurs pro-apoptotiques cytochrome c et Smac, conduisant à l'inhibition des XIAP anti-apoptotiques et la formation de l'apoptosome pour activer les caspases effectrices 3 et 7 en aval. Image à partir de [95].

3.4 LES BH3-MIMÉTIQUES COMME INDUCTEURS DE L' APOPTOSE

Comme mentionné au début du chapitre sur l'apoptose, les perturbations du programme de mort cellulaire menant à une prolifération excessive et incontrôlée constituent un risque accru pour le développement de multiples cancers [50]. L'un des facteurs permettant d'expliquer la résistance à l'apoptose observée dans les cellules de GBM est la surexpression de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 [59]. Leur suppression implique que la séquestration des membres pro-apoptotiques Bax et Bak est d'autant plus importante, et par conséquent la perméabilisation de la membrane mitochondriale nécessaire à l'activation de la voie intrinsèque ne peut pas avoir lieu. De ce fait, les protéines Bcl-2 anti-apoptotiques représentent une cible intéressante pour le développement de nouveaux médicaments visant à ré-activer la voie mitochondriale de l'apoptose [60].

Depuis plusieurs années, des chercheurs se sont intéressés au développement de petites molécules mimant la fonction des *BH3-only* pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bim, Bad et Bid), capables d'inhiber les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 en s'y liant et ainsi restaurer l'apoptose médiée par Bax et Bak. Cette nouvelle classe de molécules synthétiques pro-apoptotiques sont appelées « BH3-mimétiques » [59][61]. Aujourd'hui, plusieurs BH3-mimétiques présentant des capacités de liaison variables aux différentes protéines Bcl-2 anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, Mcl-1) ont été développés [59].

L'ABT-737 est le premier BH3-mimétique à avoir été mis en évidence par résonance magnétique nucléaire comme inhibiteur des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-X_L et Bcl-W (Figure S1) [62]. Ce composé s'est montré efficace pour induire l'apoptose dans des cellules de GBM, à la fois *in vitro* et *in vivo* [63]. Par la suite, d'autres composés dérivés de l'ABT-737 ont été développés afin de cibler spécifiquement l'une ou l'autre protéine Bcl-2 anti-apoptotique (« BH3-mimétique sélectif ») ou résoudre certaines limitations pharmacologiques, telles que l'impossibilité d'être délivré par voie orale [59]. Il est cependant important de noter que certains facteurs, tels que des niveaux élevés de la protéine anti-apoptotique Mcl-1, provoquent une résistance à l'ABT-737. De ce fait, l'efficacité des BH3-mimétique est significativement augmentée en combinaison avec d'autres traitements (radiations ionisantes, TMZ, TRAIL) [59].

Compte tenu de ces informations, l'ABT-737 est une molécule de choix pour déterminer dans un premier temps si l'activation des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose de manière concomitante permettrait d'améliorer l'efficacité d'un traitement basé sur oHSV armé avec TRAIL. Il a en effet été démontré précédemment que la combinaison de ces deux

molécules avait un effet synergique dans des cellules cancéreuses, c'est-à-dire que leur combinaison a un impact supérieur à un simple effet additif de l'effet des composés utilisés indépendamment [64][65][66]. Dans un second temps, lorsque nous aurons déterminé si l'inhibition des protéines Bcl-2 anti-apoptotiques par un BH3-mimétique est intéressante à cette fin, nous pourrions envisager un nouvel armement d'un oHSV permettant d'activer les deux voies, avec sTRAIL et un peptide codant pour un BH3-mimétique, par exemple [67].

II. OBJECTIFS

Comme expliqué dans l'introduction, les méthodes de traitement utilisées contre le GBM restent insuffisantes à ce jour et le pronostic des patients doit être amélioré. En d'autres termes, cela signifie que la résistance aux thérapies conventionnelles doit être contournée. L'utilisation de virus oncolytiques, permettant notamment de tuer spécifiquement les cellules cancéreuses et de stimuler une réponse immunitaire anti-tumorale, s'est montrée être une méthode encourageante. Ainsi, le projet dans lequel s'intègre le présent mémoire vise à augmenter l'efficacité d'un oHSV armé pour induire l'apoptose dans les cellules tumorales infectées ainsi que dans les cellules environnantes. Plus précisément, durant ce travail, trois objectifs ont été abordés :

- 1) Évaluer la capacité de oHSV-WT pCMV-sTRAIL, oHSV exprimant sTRAIL sous le contrôle du promoteur pCMV, à activer la signalisation de l'apoptose par la voie extrinsèque dans différentes lignées cellulaires de GBM.
- 2) Évaluer l'efficacité du BH3-mimétique ABT-737 à induire l'apoptose des cellules primaires de GBM en activant la voie intrinsèque. La piste de l'activation de cette voie de l'apoptose semble en effet intéressante étant donné la surexpression fréquente de membres anti-apoptotiques de la famille de protéines Bcl-2 dans de nombreux cancers, y compris le GBM.
- 3) Évaluer le potentiel d'un traitement combiné visant à activer à la fois les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose dans des cellules de GBM. Pour cela, l'infection avec oHSV-WT pCMV-sTRAIL a été combinée avec un traitement à l'ABT-737 afin de mettre en évidence une potentielle synergie.

III. MATÉRIELS

1 LIGNÉES CELLULAIRES

Sauf indication contraire, tous les types cellulaires sont maintenus en culture dans un incubateur à 37°C, avec 5% de CO₂.

1.1 CELLULES ADHÉRENTES

1.1.1 CELLULES VERO

Les cellules VERO sont des cellules épithéliales provenant d'un rein de singe. Leur caractère permissif et susceptible à l'infection par plusieurs virus, y compris HSV-1, rend cette lignée idéale pour la production et la titration de virus.

1.1.2 GB138

Il s'agit de cellules épithéliales provenant d'une masse tumorale de GBM. Elles sont cultivées en 2D comme cellules adhérentes mais peuvent former des tumorosphères lorsqu'on les place dans un milieu spécifique (milieu « Neuro »).

1.1.3 U87

Les U87 sont une lignée cellulaire humaine cancéreuse dérivant d'une tumeur de GBM. Ces cellules sont toujours cultivées en 2D.

1.2 CELLULES CULTIVÉES EN TUMOROSPHÈRES

Les lignées de cellules primaires T013, T018, T033, dérivées de tumeurs de patients, ont été utilisées. Celles-ci sont cultivées en tumorosphères afin de se rapprocher de la structure tumorale réellement observée chez les patients. Bien qu'enrichies en GSCs afin de maintenir les cellules en culture, le contenu cellulaire de ces sphères est relativement hétérogène.

2 MILIEUX DE CULTURE

2.1 CULTURE DE CELLULES ADHÉRENTES

Le milieu DMEM *high glucose* (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Biowest) est complété avec 10% de sérum foetal bovin préalablement décomplémenté (FBS, Gibco). Ce milieu, appelé ci-après DMEM HG 10% FBS, est utilisé pour la culture de cellules adhérentes.

2.2 CULTURE DE TUMOROSPHÈRES

Le milieu utilisé pour la culture 3D des cellules primaires est appelé « milieu Neuro » ; il s'agit du DMEM F-12 sans facteurs de croissance (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco), auquel sont ajoutés du B27 sans vitamine A dilué 50X (Gibco), des antibiotiques (Penicilline-Streptomycine, 1%), de l'héparine 1 $\mu\text{g/ml}$, du EGF et du hFGF à 20 ng/mL.

2.3 PRODUCTION DE VIRUS

La production de grandes quantités de virus est réalisée dans des cellules VERO. Celles-ci sont cultivées et amplifiées dans du milieu DMEM HG 10% FBS. Pour l'infection, celui-ci est remplacé par du milieu VP-SFM (*Viral Production-Serum Free Media*, Gibco) sans sérum et pauvre en protéines (5 $\mu\text{g/mL}$).

3 TAMPONS

3.1 PBS

Le PBS, *Phosphate Buffered Saline*, est un tampon non toxique utilisé pour nettoyer les cellules. Sa composition est la suivante : NaCl 8 g/L, KCl 0.2 g/L, Na_2PO_4 1.44 g/L et KH_2PO_4 0.24 g/L. Le pH de la solution est de 7.4. Le PBS stérile utilisé pour la culture de cellules est le DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) de chez Biowest.

3.2 TAMPON DE LYSE RIPA

Ce tampon est utilisé pour la lyse totale des cellules, dans le but de récupérer leur contenu protéique pour faire un Western Blot. Celui-ci contient du Tris-HCl 50 mM à pH 7.5, du NaCl 150 mM, de l'EDTA 1 mM, 1% de NP40 (Roche) et 0.25% de DOC (Deoxycholate de sodium).

3.3 TBS-TWEEN

Le TBS-Tween est utilisé pour laver les membranes pendant un Western Blot. Il contient du Tris 2.44 g/L, du NaCl 8 g/L et du HCl pour amener la solution à pH 7.6.

3.4 TAMPON DE CHARGEMENT

Ce tampon réducteur (ou « TR ») est utilisé pour la migration d'échantillons sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Sa composition est la suivante : Tris-HCl 62.5 mM à pH 6.8, 10% glycérol, 2% SDS, 3% β -mercaptoéthanol et bleu de bromophénol pour colorer la solution.

3.5 TAMPON DE MIGRATION

Ce tampon, composé de 50 mM De Tris pH 8.65, 192 mM de glycine et 3.5 mM de SDS est utilisé pour la migration des protéines sur gel de polyacrylamide dans un champ électrique.

3.6 TAMPON DE TRANSFERT

Ce tampon est utilisé pendant un Western Blot pour réaliser le transfert des protéines à partir du gel de polyacrylamide vers une membrane de nitrocellulose ou de PVDF. Il contient du Tris 25 mM, de la glycine 192 mM et 10% de méthanol.

4 GELS DE POLYACRYLAMIDE

	Gel de concentration (4%)	Gel de séparation (8%)	Gel de séparation (15%)
Acryl/bisacryl (37,5 :1) 40%	0,3 mL	1,6 mL	3 mL
Tris 0,5 pH 6,8	0,75 mL	/	/
Tris 1,5 pH 8,8	/	2 mL	2 mL
H ₂ O	1,95	4,3 mL	2,9 mL
SDS 10%	30 μ L	80 μ L	80 μ L
APS 10%	30 μ L	60 μ L	60 μ L
Temed	3 μ L	3 μ L	3 μ L

Tableau 1. Composition d'un gel de polyacrylamide. Détails de la composition d'un gel de concentration à 4% d'acrylamide et de deux gels de séparation à 8% et 15%.

5 LISTE DES ANTICORPS

Anticorps primaires	Hôte	Firme	Dilution
PARP-1	Lapin	Cell Signaling	1/1000
Caspase 8	Lapin	BD Pharmingen	1/1000
Cytochrome c	Souris	BD Pharmingen	1/1000
β -tubuline	Souris	Sigma Aldrich	1/3000
TOMM20	Lapin	Invitrogen	1/1000
GAPDH	Souris	Invitrogen	1/2000
Anticorps secondaires	Hôte	Firme	Dilution
Anti-souris (couplé à HRP)	Cheval	Cell Signaling	1/3000
Anti-lapin (couplé à HRP)	Chèvre	Cell Signaling	1/3000

Tableau 2. Liste des anticorps utilisés en Western Blot. L'animal hôte dans lequel sont produits les anticorps ainsi que les firmes dont ils proviennent et leur dilution sont indiqués. Les dilutions sont réalisées dans du TBS-T 5%, lait, excepté pour TOMM20 où il s'agit de TBS-T 0.5% BSA.

IV. MÉTHODES

1 PRODUCTION DE PARTICULES VIRALES PURIFIÉES PAR ULTRACENTRIFUGATION

Des cellules VERO sont cultivées dans du milieu DMEM HG 10% FBS, elles sont amplifiées dans douze flasques de 175 cm², jusqu'à obtenir 80-100% de confluence dans chacune d'entre elles. Le milieu de culture est ensuite remplacé par un volume relativement faible (7 mL/flasque) du milieu VP-SPM et les cellules sont infectées avec une MOI (*multiplicity of infection*) de 0.005. Les flasques sont incubées à 37°C pendant 1h30 et sont agitées régulièrement pour assurer un contact complet des cellules avec le milieu infecté. Du milieu VP-SFM est enfin ajouté pour obtenir un volume final de 20 mL et l'infection est poursuivie jusqu'au lendemain à 37°C. Les flasques sont ensuite incubées à 33°C et l'infection est observée tous les jours grâce à la GFP.

Lorsqu'environ 90% des cellules sont décollées suite à leur infection (généralement après environ 5 jours), du dextran sulfate (100 µg/mL) et du NaCl (0.45 M) sont ajoutés au milieu et les cellules sont réincubées à 33°C. Le jour suivant, les flasques sont soumises à une agitation pendant 1h30 pour décrocher l'ensemble des cellules. La fraction cellulaire est d'abord séparée et éliminée grâce à une centrifugation à 2 200 rpm pendant 10 minutes, puis le surnageant soumis à un filtre de 0.8 µm afin de supprimer les débris cellulaires. Les particules virales sont ensuite isolées du milieu par ultracentrifugation à 17 000 rpm pendant une heure et à 4°C.

Le culot est lavé au PBS puis resuspendu dans 20 à 50 µL de PBS selon sa taille et placé à 4°C *overnight*. Du glycérol est ajouté à hauteur de 10% du volume total et des aliquots de 10 à 50 µL sont répartis dans des Eppendorf de 1.5 mL pour finalement être stockés à -80°C.

2 TITRATION VIRALE

La titration virale consiste à infecter une monocouche de cellules VERO pour déterminer la concentration en particules virales infectieuses que contient un stock.

Pour cela, 190 000 cellules sontensemencées dans un plaque 24 puits dans 500 µL de milieu DMEM HG 10% FBS. Le jour suivant, le milieu est remplacé par 180 µL d'une des dilutions de virus (10^{-5} , 2.5×10^{-6} , 10^{-6} , 2.5×10^{-7} , 10^{-7} , 2.5×10^{-8}), chacune testée en triplicat. La

plaque est placée à l'incubateur pendant 1h30 et agitée toutes les demi-heures. Le milieu est ensuite aspiré et 500 μ L d'une solution de méthylcellulose (3 g/L) sont ajoutés dans chaque puits afin d'éviter l'apparition de foyers secondaires. Les plaques sont placées à l'incubateur pendant 48h, puis les foyers d'infection (plages de lyse) sont observés à l'IncuCyte®. Dans le cas où l'IncuCyte® ne peut être utilisé directement après 48h d'infection, les cellules peuvent être fixées grâce à 200 μ L d'une solution paraformaldéhyde (PAF) 4% pendant 20 minutes, puis la solution est remplacée par 500 μ L de PBS.

Enfin, les foyers d'infection sont comptés sur ImageJ et le titre viral (correspondant au nombre de particules infectieuses par unité de volume) est calculé par la formule suivante :
$$\frac{pfu}{\mu L} = \frac{\text{moyenne du nombre de foyers par puits}}{\text{dilution} \times \text{volume inoculé}}$$
. Les titres viraux des différents virus utilisés dans ce travail sont disponibles dans la figure S2 des annexes.

3 TEST DE VIABILITÉ

La viabilité des différentes lignées cellulaires soumises à différents traitements a été établie. Pour cela, les conditions de culture de tumorosphères ont été adaptées pour permettre la culture en 96 puits, optimiser la reproductibilité des résultats et réduire le nombre de cellules primaires nécessaires pour l'analyse.

Les tumorosphères sont ensemencées dans une plaque 96 puits à fond rond et faiblement adhérente (Greiner). Dans chaque puits, 10 000 cellules sont ensemencées pour les T013, T018 et T033, 5 000 pour les GB138. Le jour suivant, elles sont traitées avec l'ABT-737 ou infectées avec l'un des virus : oHSV-WT non armé ou oHSV-WT pCMV-sTRAIL. Le traitement est arrêté après un temps défini pour chaque expérience et la viabilité des cellules est établie sur base de leur activité métabolique avec le kit Cell-Titer Glo® 3D Cell Viability Assay (Promega). Placées au contact du réactif, les cellules sont lysées et la quantité d'ATP relarguée, directement proportionnelle au nombre de cellules viables présentes dans le milieu, est estimée par le signal luminescent produit. Celui-ci est mesuré par le lecteur TriStar 2 LB942 (Berthold).

4 TEST DE CYTOTOXICITÉ

L'impact de différents traitements sur des cellules T018 cultivées en tumorosphères a également été évalué par un test de cytotoxicité, basé sur le dosage de la quantité de LDH (lactate déshydrogénase) relarguée dans le milieu lorsque la membrane plasmique est endommagée. Le test utilisé dans ce travail est le LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay, Promega. Celui-ci utilise le NADH formé en parallèle de l'oxydation de pyruvate en lactate par la LDH pour produire de la luciférine. Celle-ci, placée au contact du réactif et en présence d'ATP, génère un signal luminescent pouvant être mesuré. Ainsi, l'intensité du signal est proportionnelle à la quantité de LDH dans le milieu et par conséquent à la cytotoxicité du traitement auquel les cellules ont été soumises.

5 ISOLATION DE MITOCHONDRIES

L'isolation des mitochondries a été réalisée pour visualiser en Western Blot la libération du cytochrome *c* vers le cytoplasme lorsque l'apoptose est enclenchée. Afin d'obtenir une quantité suffisante de matériel, 1.5 millions de GB138 adhérentes sont ensemencées dans une boîte de 20 cm² et traitées le lendemain. Les cellules sont récupérées après 9h et 24h de traitement et le culot est conservé à -20°C. L'analyse est réalisée comme indiquée dans les instructions du kit *Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells* (Thermo Scientific) en adaptant les volumes des solutions A, B et C au nombre de cellules de départ. Lorsque les fractions cytosolique et mitochondriale ont été isolées, du tampon de chargement est ajouté et les échantillons sont dénaturés par chauffage à 100°C pendant 3 minutes. Au même moment, 1 µL benzonase® Nuclease (Merck) est ajouté à chaque échantillon mitochondrial pour dégrader l'ADN mitochondrial et limiter leur viscosité. Ensuite, ils sont déposés sur gel de polyacrylamide et un Western Blot est réalisé.

6 WESTERN BLOT

Les analyses de Western Blot, réalisées sur extraits cellulaires totaux ou sur les fractions cytoplasmique et mitochondriale ont été réalisées sur des cellules GB138.

6.1 EXTRACTION ET DOSAGE PROTÉIQUE

Afin de récupérer les cellules en suspension, intéressantes dans le cadre de l'analyse de l'apoptose, le milieu de culture est transféré dans un Falcon de 15 mL et centrifugé pendant

10 minutes à 4 000 rpm. En parallèle, les cellules adhérentes sont lavées au PBS, décollées mécaniquement à l'aide d'un grattoir, et transférées dans un Eppendorf. Les cellules sont isolées par une centrifugation courte (1 minute à 12 000 rpm). Les cellules en suspension et adhérentes correspondant à un même traitement, issues des deux centrifugations, sont resuspendues dans du PBS et rassemblées dans un Eppendorf, centrifugé à nouveau. Les échantillons sont lysés par ajout de 50 μ L de tampon RIPA complété avec des inhibiteurs de protéases (*complete*) et incubés sur glace pendant une demi-heure. Après centrifugation à 12 000 rpm pendant 3 minutes, le surnageant de chaque tube contenant les extraits protéiques est transféré dans un autre Eppendorf. Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de Bradford, avec une lecture de l'absorbance à 595 nm (lecteur Tecan Infinite® 200 Pro). La concentration de chaque échantillon est établie en comparaison à une droite d'étalon réalisée avec une solution de BSA à 1 mg/mL.

6.2 MIGRATION ET TRANSFERT

Pour la migration des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), du tampon de chargement est ajouté à chaque extrait, puis ceux-ci sont placés pendant 3 minutes à 100°C

Pour chaque échantillon, un volume correspondant à 40 μ g de protéines est déposé dans le puits d'un gel de polyacrylamide (gel de concentration à 4% d'acrylamide et de séparation à 8% ou 15%, selon le poids moléculaire des protéines à visualiser, Tableau 1). La séparation des extraits est réalisée dans du tampon de migration avec un voltage constant de 90V à travers le gel de concentration, puis de 120V. Les protéines contenues dans les gels sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF (polyvinylidène difluoride, GE Healthcare) suite à leur exposition, dans du tampon de transfert, à un voltage de 200 mA pendant 2h.

6.3 MARQUAGE AVEC LES ANTICORPS

Une fois le transfert terminé, les membranes sont saturées par incubation dans une solution de TBS-T 5% lait pendant 45 minutes. Le marquage des protéines d'intérêt sur la membrane est réalisé par une incubation de 2h sur plateforme tournante avec des anticorps primaires spécifiques (Tableau 2). Après incubation, les membranes sont rincées trois fois 5 minutes dans du TBS-T, puis incubées à température ambiante pendant 45 minutes avec une solution contenant les anticorps secondaires couplés à HRP (peroxydase de raifort). Une fois le second marquage réalisé, les membranes sont lavées trois fois à nouveau.

6.4 RÉVÉLATION

Une solution ECL (1 mL de luminol, 100 μ L d'acide hydroxycoumarique et 0.3 μ L de H_2O_2) est utilisée pour révéler la chémiluminescence. La quantification des signaux par densitométrie est réalisée sur Image J.

7 MESURE DE L' APOPTOSE PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX

La cytométrie en flux est une technologie qui permet l'analyse multiparamétrique des cellules d'un échantillon, une à une, grâce à un système de lasers. Dans le cadre de ce mémoire, cette technique a été utilisée afin de déterminer la proportion de cellules apoptotiques dans un échantillon via le test Annexine V / DAPI.

Pour cela, 92 000 cellules (adhérentes ou en suspension, selon le type cellulaire) sontensemencées dans une plaque 24 puits et incubées à 37°C toute la nuit. Le jour suivant, elles sont soit infectées avec l'un des oHSV (armé ou non), soit traitées avec l'ABT-737. Un traitement à la camptothécine (CPT) est également réalisé comme contrôle positif pour l'activation efficace de l'apoptose [68][69].

Le jour de l'analyse (après 24h, 48h ou 72h d'infection/traitement), le surnageant de chaque puits est récupéré dans un Eppendorf et placé à la centrifugeuse à 4°C, 350 rpm pendant 5 minutes. Ensuite, s'il s'agit de cellules adhérentes, celles-ci sont détachées de la plaque à l'aide de PBS EDTA 5 mM, incubées à 4°C pendant 5 à 10 minutes. Les cellules ainsi récupérées sont ajoutées dans le tubes correspondants, centrifugés à nouveau. Pour les cellules cultivées en tumorosphères, le culot récupéré après la première centrifugation est resuspendu dans de l'accutase (Biowest) et les tubes sont placés à 37°C pendant 10 minutes pour dissocier les sphères. La réaction est arrêtée par ajout de milieu DMEM F-12 sans facteurs de croissance et les tubes sont centrifugés à nouveau.

Après avoir récupéré et dissocié toutes les cellules, elles sont lavées au PBS avant d'être centrifugées. Finalement, 140 μ L de tampon annexine (BD Pharmingen ®) est ajouté dans chaque tube en vue du marquage immunochimique. Les cellules sont marquées avec l'annexine, couplée à la phycoérythrine (PE, BD Pharmingen ®), et le DAPI (Invitrogen). Après 15 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, 100 μ L supplémentaires de tampon annexine sont ajoutés et les échantillons sont analysés immédiatement avec le FACSCanto™ II (BD Biosciences), sur le logiciel BD FACSDiva™.

Des cellules non marquées (A-/D-), ainsi que des mono-marquages (A+/D- et A-/D+) sont réalisés comme contrôles du bon fonctionnement des anticorps et serviront de référence pour l'analyse dans FlowJo™. Des compensations ont été réalisées de manière automatique sur BD FACSDiva™ afin de discriminer les signaux correspondants aux différents marqueurs : DAPI, PE (phycoérythrine, liée à l'annexine) et la GFP (exprimée par le virus).

8 QUANTIFICATION DE sTRAIL PAR ELISA

Afin de comparer la quantité de sTRAIL produite lorsque les cellules sont infectées avec le virus non armé oHSV-WT ou l'un des virus armés oHSV-WT pN-sTRAIL et oHSV-WT pCMV-sTRAIL, un dosage ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) de type sandwich a été réalisé.

Pour cela, 92 000 cellules GB138 sontensemencées de manière adhérente dans une plaque 24 puits, dans 300 µL de milieu DMEM HG 10% FBS. Le lendemain (48h de traitement) et le jour suivant (24h de traitement), les cellules sont infectées avec une MOI de 1 par le virus non armé et les deux virus armés. Des cellules non infectées sont également prévues comme contrôle négatif. Chaque condition est réalisée en duplicat. Le jour de l'analyse, la préparation des réactifs, des échantillons et de la courbe standard est réalisée comme décrite dans le protocole du kit (TRAIL ELISA kit, MyBiosource) et la concentration de sTRAIL présente dans le milieu de culture est évaluée après une mesure d'absorbance au lecteur Tecan Infinite® 200 Pro.

9 ANALYSES STATISTIQUES

Les analyses statistiques de ce mémoire ont été réalisées sur le logiciel GraphPad Prism. Les données présentées indiquent la moyenne de plusieurs résultats indépendants et les barres d'erreur représentent les erreurs standard à la moyenne (*mean* ± *SEM*). Un résultat est considéré significatif (*) lorsque la p-valeur est inférieure à 0.05.

V. RÉSULTATS

1 RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES

Avant d'entamer la description des résultats générés durant ce mémoire, il est d'abord important de résumer les résultats préalablement obtenus au laboratoire concernant l'utilisation du virus oHSV armé.

Le virus oHSV-Nb pN-sTRAIL généré au laboratoire est un virus qui, d'une part, cible spécifiquement les cellules CXCR4+ (un marqueur des GSCs) à l'aide d'un nanobody anti-CXCR4 (Nb) inséré dans la glycoprotéine gD, et d'autre part exprime le transgène sTRAIL sous le contrôle du promoteur nestine. Son utilisation dans des cellules de glioblastome s'est montrée encourageante. Dans des cellules U87 transduites avec CXCR4 (U87 CXCR4+), l'infection par ce virus a entraîné une induction de l'apoptose significativement plus importante que lors d'une infection par l'oHSV non armé [42] (Figure S3, Annexes). Toutefois, ces données obtenues *in vitro* sur la lignée cellulaire U87 CXCR4+ n'ont pas pu être confirmées sur les différentes cellules primaires de GBM testées. Dans ces dernières, la susceptibilité à l'infection ainsi que la proportion de mort induite par sTRAIL s'est montrée variable (Figure 15). En effet, des cellules T018 et T033, issues de résection chirurgicale de glioblastome et dont l'expression de CXCR4 a été vérifiée par cytométrie en flux se sont avérées peu ou pas sensibles à la mort induite par le virus et/ou par sTRAIL. Aucun des deux virus testés n'a eu d'impact significatif sur la survie des cellules T033, alors que les T018 qui semblent plus sensibles à la mort induite par l'oHSV, ne sont pas sensibles à la mort induite par sTRAIL.

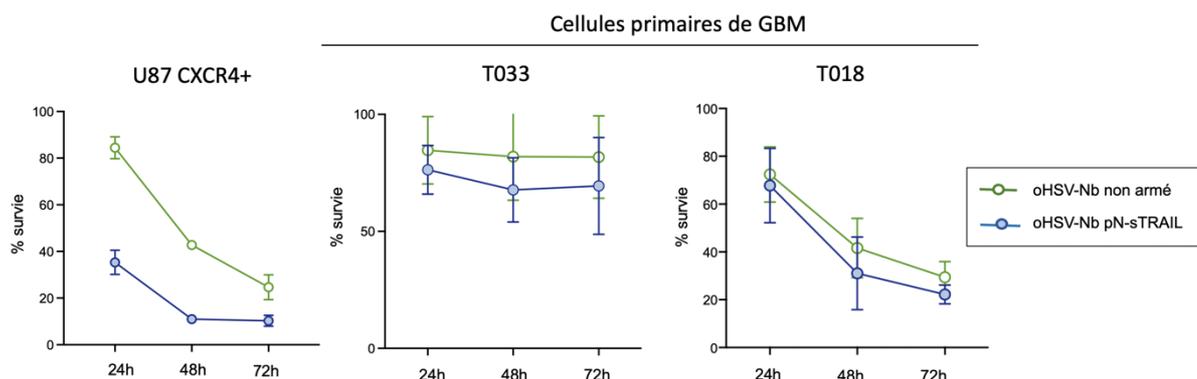


Figure 15. Pourcentage de mort cellulaire induite par une infection avec un oHSV armé (oHSV-Nb pN-sTRAIL) ou non armé (oHSV-Nb) dans des cellules de GBM. Résultats obtenus par un test à la résazurine après 24, 48 et 72h d'infection sur la lignée U87 CXCR4+ et deux types de cellules primaires (T033 et T018). Résultats non publiés.

L'expression de sTRAIL étant sous le contrôle du promoteur nestine, l'impact variable de l'armement sur les différentes lignées peut notamment s'expliquer par le niveau d'activation de ce promoteur. Bien que décrite dans la littérature comme un marqueur des GSCs, l'expression de nestine évaluée par qRT-PCR semble varier fortement entre plusieurs types de cellules (Figure 16), ce qui laisse présager une expression très variable de sTRAIL.

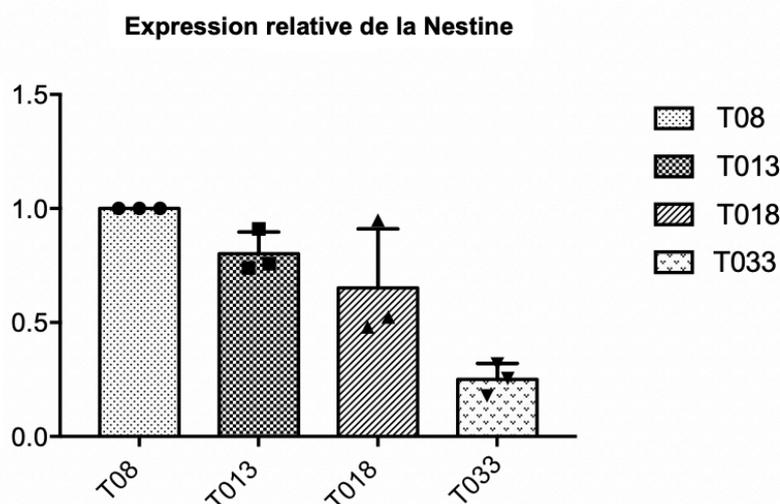


Figure 16. Expression relative de la Nestine entre différentes cellules primaires de GBM déterminée par RT-qPCR. Données non publiées.

Ces résultats suggèrent que l'armement du virus oncolytique doit être optimisé et qu'il serait intéressant d'envisager l'utilisation d'un promoteur fort pour contrôler l'expression de sTRAIL afin d'éviter l'effet limitant que pourrait avoir le promoteur nestine, étant donné son expression inégale dans les cellules. Par ailleurs, l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose par sTRAIL pourrait ne pas être suffisante dans certaines cellules primaires. Induire une synergie avec un stimulus activant la voie intrinsèque de l'apoptose pourrait constituer une alternative intéressante qui a été envisagée dans le cadre de ce travail.

2 COMPARAISON DE oHSV-WT pN-sTRAIL ET oHSV-WT pCMV-sTRAIL

2.1 PRODUCTION DE sTRAIL

Dans un premier temps, nous avons évalué l'efficacité des deux virus armés (oHSV-WT pN-sTRAIL et oHSV-WT pCMV-sTRAIL) quant à l'expression du transgène afin de déterminer si la nouvelle construction plaçant sTRAIL sous le contrôle de pCMV augmente l'expression et la sécrétion de sTRAIL.

Des cellules GB138, cellules primaires de glioblastome cultivées en monocouche, ont été infectées par oHSV-WT, oHSV-WT pN-sTRAIL ou oHSV-WT pCMV-sTRAIL avec une MOI de 1. Le surnageant de culture a été récupéré après 24 et 48 heures d'infection afin de déterminer, par ELISA, la quantité de sTRAIL sécrétée dans le milieu. Même si l'infection par le virus non-armé induit une faible expression de sTRAIL, cette expression est significativement augmentée quel que soit le virus armé utilisé (oHSV-WT pN-sTRAIL et oHSV-WT pCMV-sTRAIL) (Figure 17). Dans ces conditions, la concentration de sTRAIL détectée après 24 et 48h d'infection par l'un ou l'autre virus armé oscille entre environ 320 et 430 pg/mL. Bien que la sécrétion efficace de sTRAIL par les cellules infectées par oHSV-WT pCMV-sTRAIL valide l'utilisation de cette nouvelle construction, l'absence de différence significative entre les deux virus armés ne nous permet pas de conclure à un avantage de la construction pCMV sTRAIL dans les GB138.

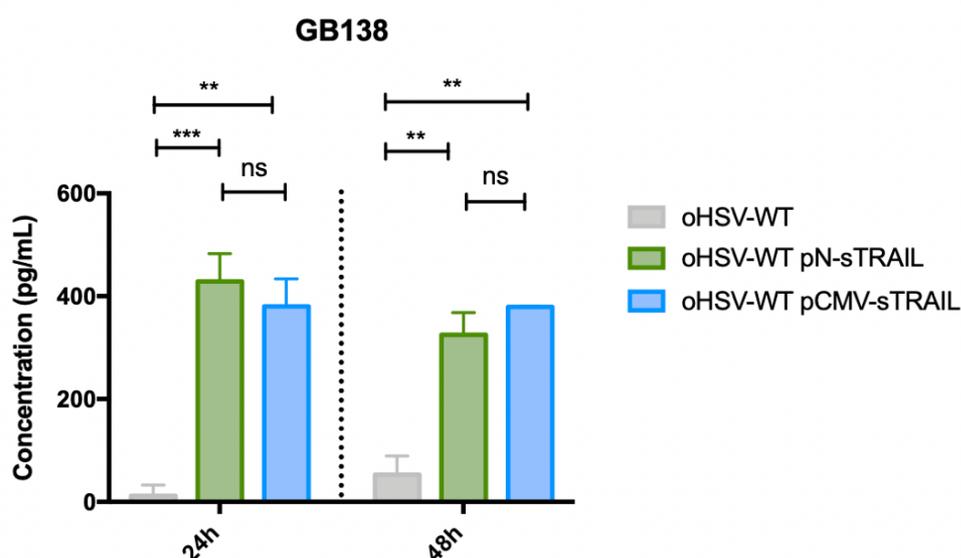


Figure 17. Quantification par ELISA de la production de sTRAIL dans le surnageant de cellules primaires GB138 infectées par oHSV-WT, oHSV-WT pN-sTRAIL ou oHSV-WT pCMV-sTRAIL (MOI de 1) pendant 24h ou 48h. Le graphique représente les moyennes des duplicats d'une même expérience pour chaque condition, avec des barres d'erreur standard à la moyenne. Two-way ANOVA, ns = non significatif, ** = $p < 0.01$ et *** = $p < 0.001$.

2.2 INDUCTION DE L'APOPTOSE SUR UNE LIGNÉE DE CELLULES DE GBM

Afin d'évaluer l'efficacité de sTRAIL, la proportion de cellules apoptotiques suite à une infection virale a été mesurée par l'analyse en cytométrie en flux de l'incorporation d'annexine et de DAPI. Cette technique, classiquement utilisée pour quantifier l'apoptose, se base d'une part sur la capacité de liaison de l'annexine à la phosphatidylsérine, localisée sur le feuillet externe de la membrane plasmique lorsque les cellules sont en apoptose, et d'autre part sur la liaison du DAPI à des régions de l'ADN riches en A-T. Les informations ainsi obtenues quant à l'intégrité de la membrane plasmique permettent de distinguer les cellules vivantes (A-/D-) des cellules en apoptose précoce (A+/D-), tardive (A+/D+), ou en nécrose (A-/D+).

L'analyse des populations de cellules ainsi marquées est effectuée comme suit. Dans un premier temps, les cellules sont analysées sur base de leur taille (FSC, *Forward scatter*) et de leur granulosité (SSC, *side scatter*), ce qui permet d'exclure les débris cellulaires et de ne continuer l'analyse que sur la population cellulaire (Figure 18a). Les cellules sont ensuite analysées sur base de l'aire (FSC-A) et de la hauteur (FSC-H) du signal, de manière à restreindre l'analyse aux cellules isolées (*single cells*). De cette manière, les signaux correspondant à plusieurs cellules traversant en même temps le laser sont exclus (Figure 18b). Enfin, les paramètres de fluorescence pour les deux marqueurs d'intérêt sont étudiés. Les populations positive et négative pour chacun des deux marqueurs sont déterminées grâce à des contrôles mono-marqués : le contrôle A+/D- permet de définir une séparation sur l'axe du DAPI, A-/D+ sur celui de l'annexine (Figure 18c). Il apparaît alors quatre quadrants sur le panel, renseignant l'état d'apoptose des cellules d'un échantillon. La quantification du pourcentage de cellules apoptotiques correspond à la somme des quadrants correspondants à l'apoptose précoce (Q3, A+/D-) et tardive (Q2, A+/D+) (Figure 18d).

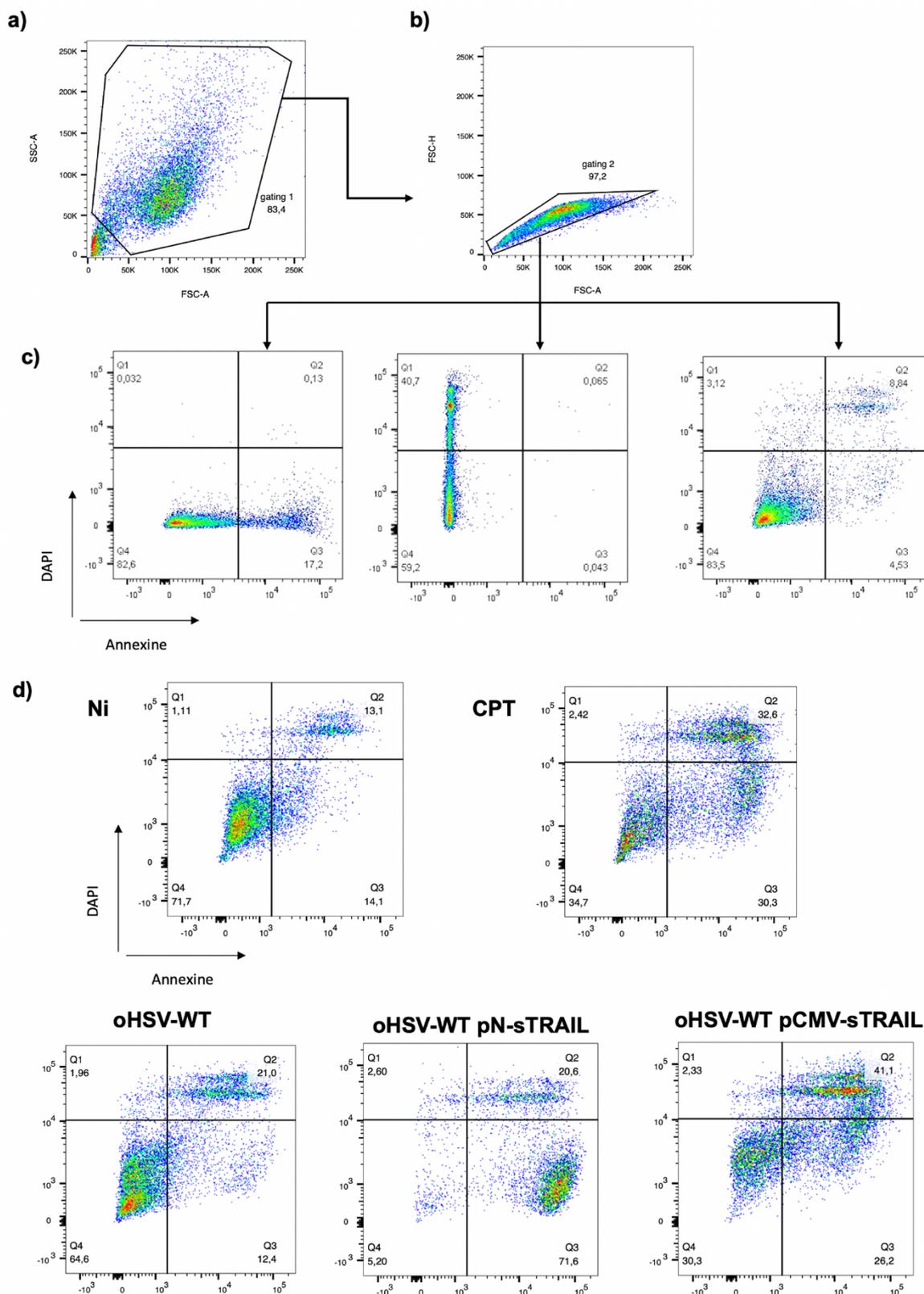


Figure 18. Stratégie de «gating» pour l'analyse de l'apoptose en cytométrie en flux (test Annexine/DAPI) sur la lignée U87. a) Exclusion des débris cellulaires dans des cellules infectées par oHSV-WT pendant 72h. b) Exclusion des doublets. c) Détermination des populations positive et négative pour l'annexine (A) et le DAPI (D) à l'aide de contrôle mono-marqués, de gauche à droite : A+/D-, A-/D+ et A+/D+. d) Exemple de résultat obtenu pour les trois infections (oHSV-WT, oHSV-WT pN-sTRAIL et oHSV-WT pCMV-sTRAIL) ainsi que les contrôles non infecté (Ni) et traitement à la camptothécine (CPT, 7.5 μ M).

Dans un premier temps, la capacité des virus oncolytiques armés ou non à induire l'apoptose a été évaluée dans la lignée U87. Ces cellules ont été infectées par les différents virus avec une MOI de 1 et le pourcentage de cellules apoptotiques a été quantifié 72h après l'infection. Un traitement à la camptothécine (7.5 μ M), composé induisant des dommages à l'ADN en bloquant la topoisomérase I et induisant l'apoptose, a été réalisé comme contrôle positif [70].

L'analyse en cytométrie en flux démontre une induction significative de l'apoptose par les deux virus armés, en comparaison de celle observée dans les cellules infectées par le virus non armé (Figure 19). Néanmoins, l'expression de sTRAIL sous le contrôle du promoteur CMV ne semble pas induire plus efficacement la mort des cellules U87 infectées que lorsque sTRAIL est exprimé sous le contrôle du promoteur nestine. Notons que la différence d'apoptose induite par l'un ou l'autre virus armé est non significative.

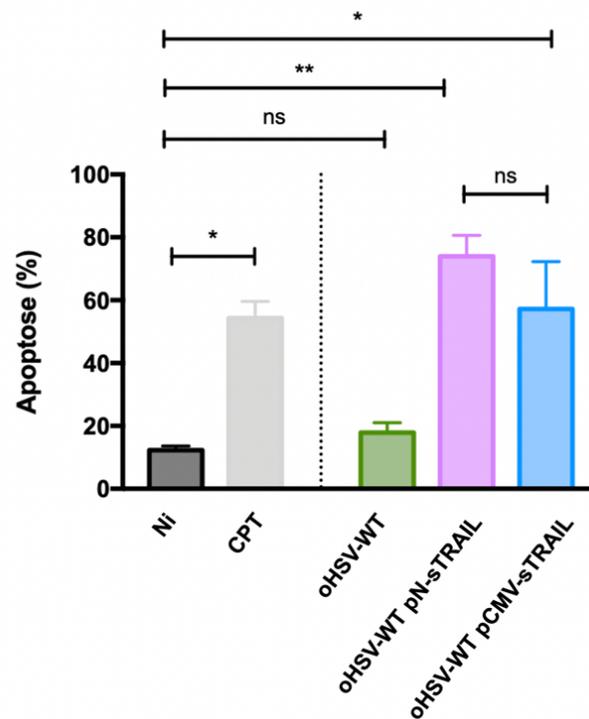


Figure 19. Quantification par cytométrie en flux de l'apoptose induite dans des U87 après 72h d'infection par un oHSV armé ou non avec une MOI de 1. Le traitement à la camptothécine sert de contrôle positif (CPT, 7.5 μ M), les cellules non infectées de contrôle négatif (Ni). Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes, avec les barres d'erreur standard à la moyenne. One-way ANOVA, ns = non significatif, * = $p < 0.05$ et ** = $p < 0.01$.

3 INDUCTION DE L' APOPTOSE DANS DES CELLULES PRIMAIRES DE GBM PAR OHSV-WT pCMV-sTRAIL

Après avoir validé la capacité de oHSV-WT pCMV-sTRAIL à induire l'apoptose dans les cellules U87, une lignée de glioblastome, son efficacité a été mesurée dans les cellules GB138 et T033, deux lignées de cellules primaires provenant de résection chirurgicale de glioblastome. Les T033 et GB138, cultivées en tumorsphères, ont été infectées avec une MOI de 1 ou traitées à la camptothécine (7.5 μ M) et la proportion de cellules apoptotiques a été évaluée par cytométrie en flux après 24h, 48h et 72h d'infection ou de traitement.

3.1 DANS LES CELLULES T033

Dans les T033, nous pouvons observer une progression des cellules viables vers les quadrants apoptotiques lorsque celles-ci sont traitées à la CPT ou avec et l'un des deux virus. Celles-ci semblent quitter peu à peu le quadrant correspondant aux cellules viables (Q4) pour évoluer vers l'apoptose précoce (Q3), puis tardive (Q2) (Figure S4).

Bien que la quantité totale d'apoptose dans les cellules traitées à la CPT ou infectées par l'un des deux virus augmente au cours du temps et est plus élevée que dans les cellules contrôles (non infectées et non traitées) dans lesquelles le pourcentage de cellules apoptotiques reste stable, une variabilité considérable entre les expériences a été mise en évidence (Figure 20a). L'analyse statistique (two-way ANOVA) de la quantification de ces trois expériences indépendantes ne permet pas d'observer des différences significatives entre la condition contrôle (Ni) et les différents traitements. Enfin, il semblerait que l'armement du virus avec sTRAIL n'induit pas d'avantage d'apoptose dans les cellules T033, comparé au virus non armé. Cependant, aucune différence observée entre l'effet des deux virus n'est statistiquement significative.

3.2 DANS LES CELLULES GB138

Le test Annexine V / DAPI a également été réalisé sur des GB138 afin de comparer l'impact du virus armé sur différents types cellulaires. Contrairement aux T033 où l'expérience a pu être réalisée trois fois, seule une expérience effectuée sur les GB138 ayant fourni des résultats interprétables est présentée dans ce travail. Les autres répétitions de celle-ci ont été écartées de l'analyse car les résultats obtenus dans les conditions contrôles étaient aberrants.

Tout comme c'était le cas pour les T033, les GB138 semblent progresser vers un état d'apoptose précoce, puis tardive, lorsqu'un traitement pro-apoptotique est appliqué (CPT, 7.5

μM ou l'un des oHSV avec une MOI de 1) (Figure S5). Bien que les GB138 se divisent plutôt rapidement, les cellules non traitées (Ni) mises en culture pendant 24h, 48h et 72h semblent peu impactées par la confluence ; leur viabilité reste relativement constante au cours du temps.

La quantification des résultats obtenus en cytométrie flux sur les GB138 suggère un avantage de l'armement à partir de 72h d'infection (Figure 20b). Alors que l'apoptose induite par le virus non armé apparaît constante au cours du temps, celle-ci augmente avec le virus oHSV-WT pCMV-sTRAIL. L'unique expérience valide présentée ici, et par conséquent l'absence d'analyse statistique, ne nous permet malheureusement pas de tirer des conclusions quant à l'efficacité du oHSV armé sur les GB138 dans ces conditions.

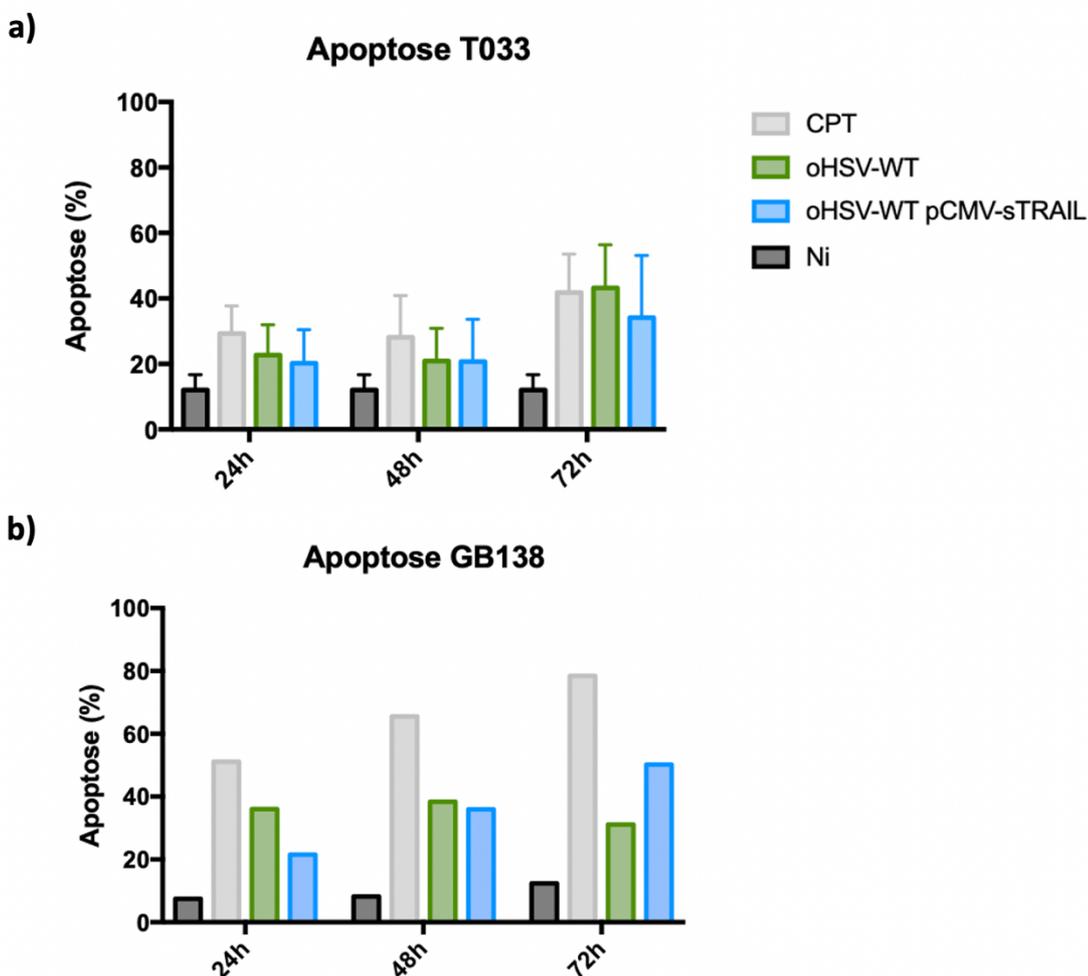


Figure 20. Quantification de l'apoptose par cytométrie en flux dans des cellules primaires de glioblastomes. Cellules primaires infectées par oHSV-WT ou oHSV-pCMV-sTRAIL avec une MOI de 1. Les cellules non infectées (Ni) servent de contrôle négatif, celles traitées à la camptothécine de contrôle positif (CPT, $7.5 \mu\text{M}$). **a)** Résultat de trois expériences indépendantes sur des cellules T033 avec les barres d'erreurs standard à la moyenne. **b)** Résultat d'une seule expérience sur les cellules GB138.

4 EFFICACITÉ DE L'ABT-737

Compte tenu de l'efficacité variable d'un virus armé avec sTRAIL, nous avons décidé d'explorer la piste de l'activation de l'apoptose via la voie intrinsèque. Pour ce faire, nous avons traité les différentes cellules primaires de GBM avec l'ABT-737, un BH3-mimétique.

4.1 ÉTUDE DE L'IMPACT DE L'ABT-737 AU COURS DU TEMPS

Dans un premier temps, l'impact d'un traitement à l'ABT-737 pendant des temps variables a été évalué par des tests de cytotoxicité ou de viabilité. L'intérêt principal que représente l'utilisation de l'un de ces tests par rapport à la cytométrie en flux est le nombre réduit de cellules nécessaires pour l'analyse. Quatre lignées de cellules primaires de GBM (GB138, T018, T013 et T033) ont étéensemencées pour former des petites tumorosphères et ont été traitées à l'ABT-737 (10 μ M) pendant 0h, 8h, 24h et 32h. La durée du traitement ainsi que le concentration en ABT-737 ont été déterminées par rapport aux expériences déjà décrites dans la littérature [71][72]. L'impact du DMSO, dans lequel l'ABT-737 est resuspendu, a aussi été évalué afin d'exclure un effet de celui-ci sur la viabilité cellulaire.

4.1.1 COMPARAISON DE LA VIABILITÉ ET DE LA CYTOTOXICITÉ

Au départ, deux méthodes ont été testées en parallèle sur les cellules T018 : l'une visant à évaluer la cytotoxicité de l'ABT-737 en dosant la quantité de LDH (lactate déshydrogénase) relarguée par les cellules lorsque l'intégrité de la membrane plasmique est altérée, l'autre visant à évaluer la viabilité des cellules soumises à l'ABT-737 selon leur activité métabolique.

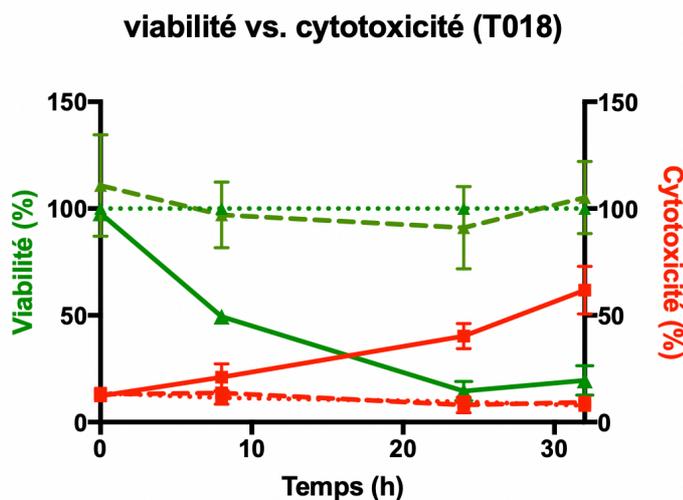


Figure 21. Graphique combiné des résultats de viabilité et de cytotoxicité de cellules T018 suite à un traitement à l'ABT-737 (10 μ M, lignes continues) pendant 0h, 8h, 24h et 32h. Des cellules non traitées (pointillés) et traitées au DMSO (lignes discontinues) servent de contrôles négatifs. Les résultats représentent la moyenne de 2 ou 3 expériences indépendantes pour la cytotoxicité et viabilité, respectivement.

Comme l'indiquent les résultats présentés à la figure 21, les cellules T018 soumises à un traitement à l'ABT-737 ont montré une baisse de viabilité et une augmentation de la cytotoxicité au cours du temps. Le traitement au DMSO, quant à lui, n'a entraîné de changement significatif pour aucune de ces variables. Compte tenu des profils très similaires obtenus via ces deux méthodes (bien que logiquement inversés), nous avons conclu que l'un ou l'autre test utilisé permettrait d'évaluer l'impact de l'ABT-737 sur les différentes cellules primaires. Ainsi, le test de viabilité a été privilégié pour le reste des analyses sur base de sa facilité d'utilisation, de la meilleure répétabilité des résultats et de son moindre coût.

4.1.2 ÉTUDE DE LA VIABILITÉ

Une fois le choix du test arrêté, celui-ci a été réalisé sur les autres cellules primaires de GBM. Suite aux résultats obtenus grâce au test de viabilité (Figure 22), deux observations ont pu être réalisées. Premièrement, la sensibilité à l'ABT-737 apparaît variable entre les différents types cellulaires. Nous observons par exemple que les GB138 et les T013 n'y semblent que relativement peu sensibles, avec environ 70% de cellules viables après 24h de traitement alors que les T018 et les T033, au contraire, voient leur viabilité baisser drastiquement, avec seulement 14% et 16% de cellules viables après 24h, respectivement. Secondement, ces résultats nous ont permis de déterminer une durée de traitement idéale. Puisque 24h de traitement à l'ABT-737 (10 μ M) suffisent à entraîner une baisse significative de la viabilité dans l'ensemble des lignées testées, cette durée sera utilisée pour la suite des expériences.

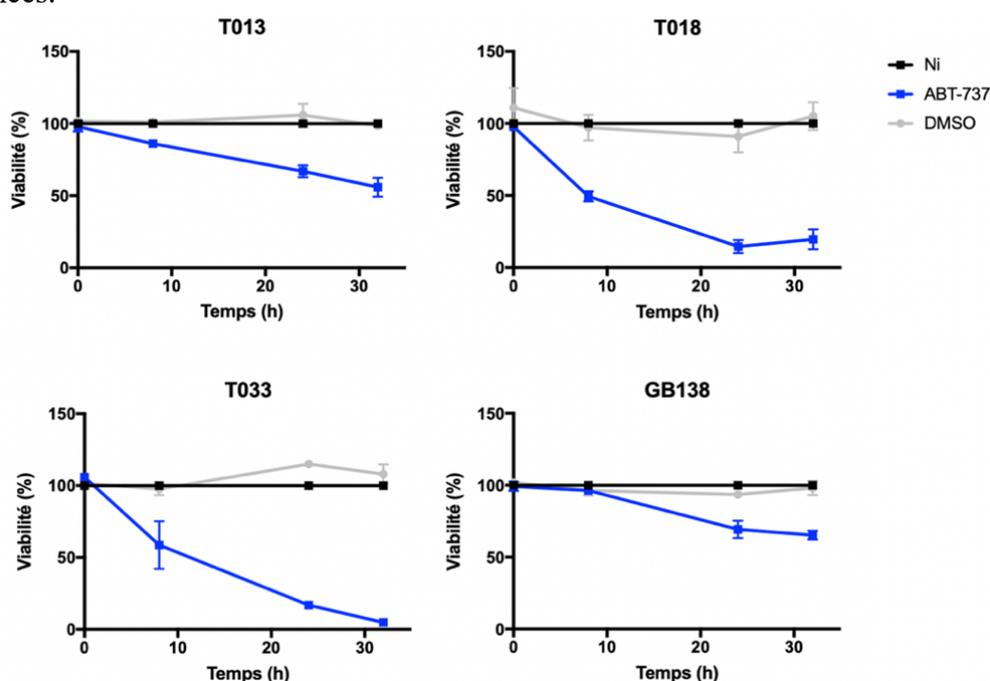


Figure 22. Viabilité de cellules primaires de GBM suite à un traitement à l'ABT-737 (10 μ M) pendant 0, 8, 24 et 23h. Les graphiques représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes, avec les barres d'erreur standard à la moyenne.

4.2 INDUCTION DE L' APOPTOSE

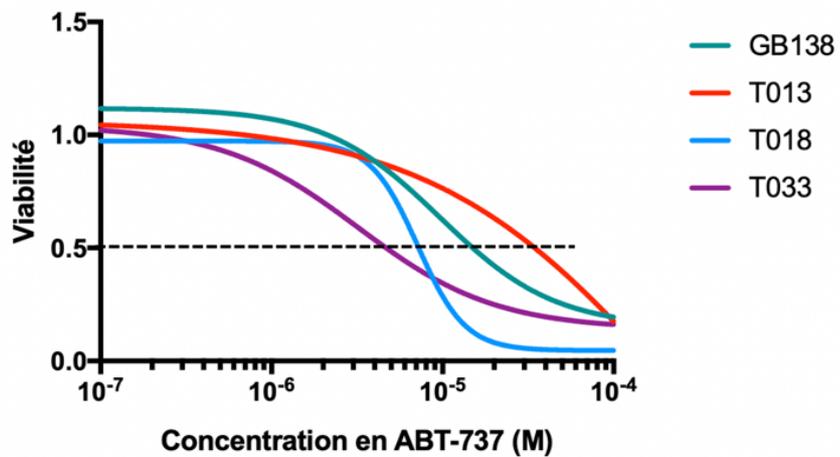
Les résultats obtenus avec le test de viabilité ont été confirmés par cytométrie en flux avec le test Annexine V / DAPI. Par manque de temps, ce test n'a été effectué que sur deux types cellulaires, les T033 et les GB138 (respectivement en triplicat et avec une expérience unique) mais devrait être répété sur les autres cellules primaires de GBM. Les résultats de ce test indiquent qu'environ 52% des cellules T033 et 54% de GB138 sont apoptotiques après 24h de traitement avec 10 μ M d'ABT-737 (Figure S6). L'analyse statistique réalisée pour les T033 (test de Student) confirme que l'apoptose induite par l'ABT-737 est significativement différente de celle observée dans les cellules non traitées.

4.3 COMPARAISON DE LA SENSIBILITÉ DES DIFFÉRENTES CELLULES PRIMAIRES DE GBM

La sensibilité des quatre lignées de cellules primaires a ensuite été évaluée par un test de dose-réponse. Dans cette expérience, des concentrations croissantes d'ABT-737 allant de 0 à 100 μ M sont appliquées aux différentes lignées dans le but de déterminer leur IC₅₀, ou concentration médiane inhibitrice. Celle-ci correspond à la concentration d'ABT-737 nécessaire pour induire une baisse de 50% de la viabilité. Cette baisse de viabilité, présentée sous forme d'histogrammes pour les quatre types cellulaires, est disponible dans la figure S7 des annexes. Un graphique représentant la viabilité exprimée pour chaque concentration comme un ratio [*viabilité ABT-737 / viabilité DMSO*] nous a permis de calculer l'IC₅₀ (Figure 23a). Un ratio égal à 1 correspond à la mesure de viabilité des cellules non traitées. Une courbe établie à partir des valeurs obtenues pour chacune des concentrations est générée automatiquement et permet de déterminer la valeur de IC₅₀ (GraphPad Prism).

De cette manière, chaque lignée est caractérisée par une valeur d'IC₅₀ qui témoigne de sa sensibilité à l'ABT-737 (Figure 23b). Une valeur élevée indique qu'une plus grande concentration d'ABT-737 est nécessaire pour atteindre une diminution de 50% de la viabilité et témoigne donc d'une faible sensibilité des cellules. Ainsi, les lignées testées peuvent être classées de la plus sensible vers la plus résistante de la manière suivante : T033 > T018 > GB138 > T013.

a) **Comparaison des doses-réponse entre les types cellulaires**



b)

Lignée	T033	T018	GB138	T013
IC ₅₀ (μM)	3,2	7,2	9,7	210,7

Figure 23. Comparaison de la sensibilité des différentes cellules primaires de GBM à l'ABT-737. a) Graphique représentant les courbes établies sur base des ratios [viabilité ABT-737 / viabilité DMSO] en fonction de la concentration croissante en ABT-737 (de 0 à 100 μM) pour les GB138, T013, T018 et T033. b) Estimation des valeurs d'IC₅₀. Résultats issus de 3 expériences indépendantes, analyses réalisées sur GraphPad Prism.

5 INDUCTION DES DEUX VOIES DE L' APOPTOSE

Après avoir testé l'impact du virus armé d'une part et de l'ABT-737 d'autre part sur la viabilité des cellules GBM, nous avons voulu nous assurer que cette mort résultait effectivement de l'activation de l'apoptose. L'induction des voies intrinsèque et extrinsèque a donc été vérifiée par Western Blot (WB). Ainsi, un WB a été réalisé sur des extraits protéiques issus de cellules GB138 cultivées en monocouche et traitées avec de l'ABT-737 (10 μ M) ou infectées par oHSV-WT ou oHSV-WT pCMV-sTRAIL (MOI 1) pendant 9h ou 24h. La camptothécine (7.5 μ M) est utilisée comme contrôle pour l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose.

Le cytochrome *c* et le clivage de la procaspase 8 ont été choisis comme marqueurs de l'activation de la voie intrinsèque et extrinsèque respectivement. PARP-1, clivé lors d'une des dernières étapes de la voie de signalisation de l'apoptose, témoigne de l'activation de l'une ou l'autre voie. Selon la protéine recherchée, les analyses ont été réalisées sur des extraits cellulaires totaux (PARP-1) ou provenant de fractions cytoplasmique (procaspase 8) ou mitochondriale (cytochrome *c*). La qualité de l'extraction protéique de chaque fraction est validée par la présence de contrôles de charge : GAPDH pour la lyse totale, β -tubuline pour le cytoplasme et TOM20 pour la fraction mitochondriale. La présence de la glycoprotéine gD dans les extraits issus de cellules infectées témoigne de la réplication virale dans ces cellules.

Les résultats du Western Blot réalisé sur les extraits protéiques totaux (Figure 24a) révèlent le clivage de PARP-1 (apparition d'une bande à 89 kDa) tant en réponse au traitement à l'ABT-737 qu'à l'infection par oHSV-WT pCMV-sTRAIL. Néanmoins, le clivage de PARP-1 est observé dès 9 heures de traitement avec ABT-737 alors qu'il n'est détecté qu'après 24h d'infection avec le virus armé, reflétant une activation plus rapide de l'apoptose par l'ABT-737 que par l'infection.

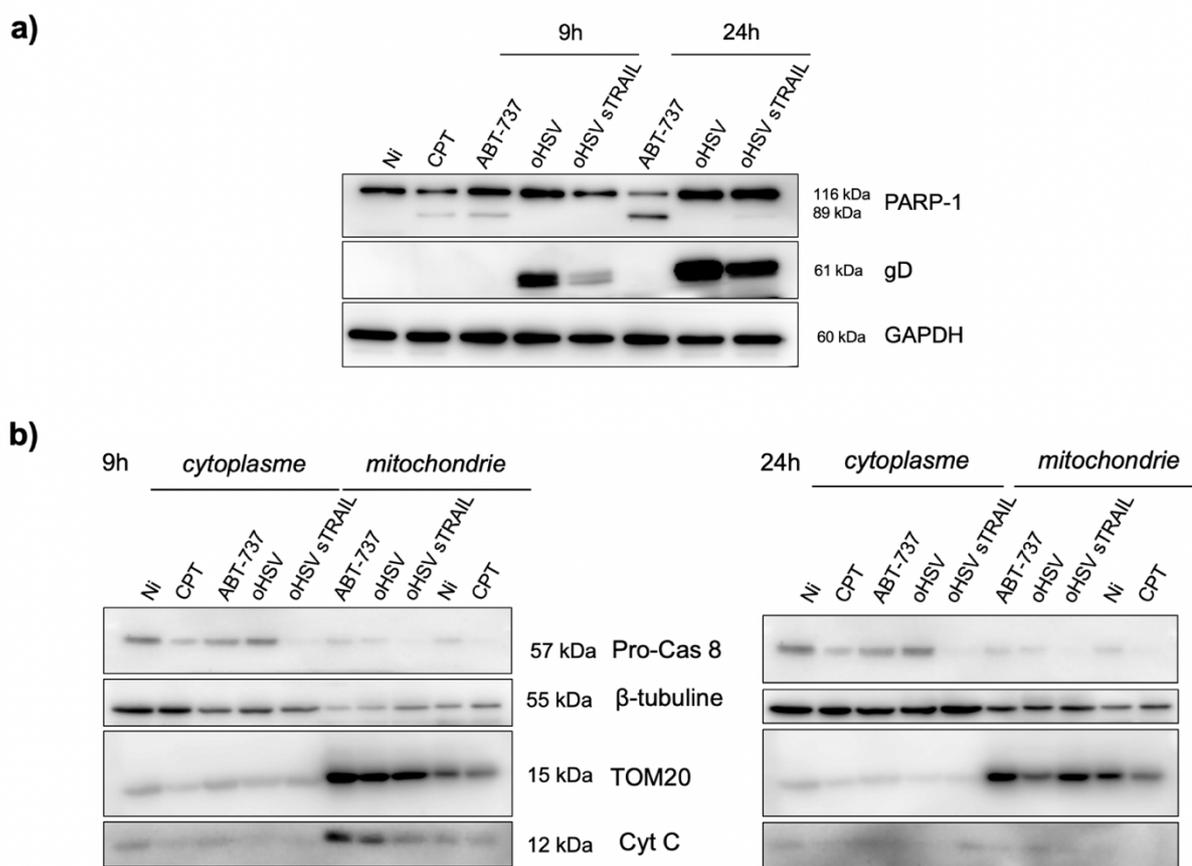


Figure 24. Évaluation de l'activation de l'apoptose dans des cellules GB138 par Western Blot après 9h et 24h de traitement. **a)** Détection de PARP-1, gD et GAPDH sur des extraits cellulaires totaux traités à l'ABT-737 (10 μ M) ou infectés avec l'un des virus (MOI 1). Les contrôles non infecté (Ni) et le traitement à la camptothécine (CPT, 7.5 μ M) sont réalisés après 24h de traitement. **b)** Détection de la pro-caspase 8, β -tubuline, TOM20 et cytochrome c dans les fractions cytoplasmique et mitochondriale. Les cellules non traitées (Ni) et traitées à la CPT (7.5 μ M) servent respectivement de contrôle négatif et positif. Résultat d'une expérience unique.

L'analyse des résultats obtenus sur les fractions mitochondriale et cytoplasmique (Figure 24b) s'avère un peu plus complexe. La quantité de protéines dans ces extraits n'ayant pas pu être dosée, le dépôt protéique s'est avéré inhomogène. Afin de rendre possible l'interprétation de ces résultats, le WB a été quantifié. Pour cela, une densitométrie des bandes correspondant aux protéines d'intérêt (procaspase 8 et cytochrome c) a été réalisée (Image J) et rapportée à la densitométrie des bandes correspondant aux contrôles (β -tubuline et TOM20, respectivement). Les résultats ont ensuite été normalisés en considérant la quantité de protéine d'intérêt dans l'échantillon non traité comme étant égale à 1. L'expression de la procaspase 8 a été mesurée après 9h et 24h de traitement dans la fraction cytosolique. Celle du cytochrome c a uniquement été mesurée après 9h de traitement (le gel à 24h ne le permettant pas). Les résultats, présentés dans la figure 25, sont cependant à interpréter avec précaution car il s'agit d'une expérience réalisée une seule fois.

Une diminution du cytochrome *c* dans la fraction mitochondriale n'a pu être observée après 9h de traitement qu'avec traitement contrôle à la camptothécine. L'infection avec les virus armés ou non, ainsi que le traitement à l'ABT-737 ont quant à eux entraîné une augmentation du cytochrome *c* dans cette fraction.

La procaspase 8, quant à elle, a vu son expression diminuer faiblement pour toutes les conditions à 9h de traitement comparé aux cellules non traitées. Après 24h, en revanche, ce niveau a augmenté considérablement avec le traitement à l'ABT-737 ainsi que pour l'infection avec oHSV-WT. Seule l'infection avec le virus armé a entraîné une diminution nette de l'expression de la procaspase 8, indiquant probablement le clivage de celle-ci au profit de la forme clivée active Cas 8. Ces résultats indiquent que, contrairement à l'ABT-737 et à l'infection par le virus non-armé, sTRAIL active efficacement la voie extrinsèque de l'apoptose.

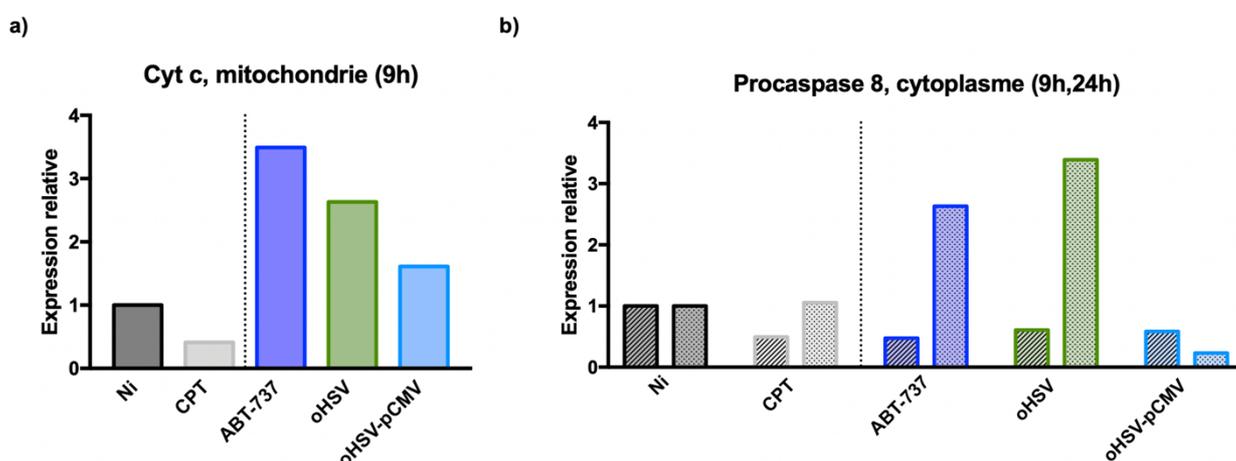


Figure 25. Évolution de l'expression relative du cytochrome *c* et de la procaspase 8 par Western Blot. Quantification d'un Western Blot réalisé sur les extraits de cellules non infectées (Ni), traitées à la CPT (7.5 μ M), à l'ABT-737 (10 μ M), infectées avec oHSV-WT ou oHSV-WT pCMV-sTRAIL (MOI de 1). Expérience unique. **a)** Expression du cytochrome *c* dans la mitochondrie après 9h de traitement. **b)** Expression de la procaspase 8 après 9h et 24h de traitement, représentée par les histogramme respectivement hachurés et pointillés.

6 SYNERGIE ENTRE LES DEUX VOIES DE L' APOPTOSE

Comme expliqué dans les objectifs de ce mémoire, les tests qui ont été effectués sur la mort cellulaire induite par un traitement à l'ABT-737 ont été réalisés en vue d'un potentiel armement combiné d'un oHSV, dans lequel une séquence codant pour un peptide BH3-mimétique pourrait être intégrée. Ainsi, après avoir montré que l'ABT-737 était efficace sur l'ensemble des lignées de GBM utilisées au laboratoire, certes de manière différentielle, nous avons évalué si un traitement combiné apporterait un avantage au virus armé existant. Pour cela, des cellules GB138, démontrant une sensibilité intermédiaire à l'ABT-737 (Figure 23), ont été cultivées en tumorosphères, infectées pendant 72h avec un oHSV armé ou non (oHSV-WT ou oHSV-WT pCMV-sTRAIL ; MOI de 1), et traitée ou non à l'ABT-737, ce dernier étant ajouté ou non au milieu de culture 24h avant la fin de l'expérience.

Afin de ne pas induire une diminution trop importante de la viabilité des cellules avec un traitement à l'ABT-737 seul, ce qui pourrait masquer un potentiel effet synergique, nous avons arrêté sa concentration à 5 μ M pour réaliser les tests de traitement combinés. En effet, puisque l'IC₅₀ calculée à la figure 23 pour les GB138 vaut approximativement 10 μ M, cette concentration en ABT-737 entrainerait la mort d'environ 50% des cellules à elle seule. Selon le même raisonnement, l'infection virale a été réalisée avec une MOI de 1. Les résultats des traitements combinés sont présentés dans le figure 26.

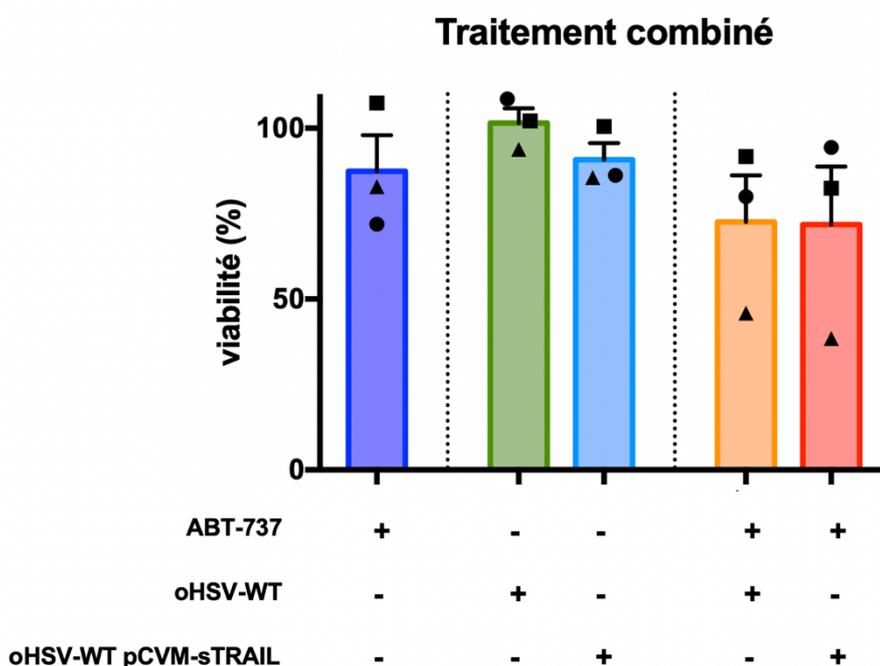


Figure 26. Évaluation de l'impact d'un traitement combiné sur la viabilité de cellules GB138. Combinaison d'une infection par un oHSV armé (oHSV-WT pCMV-sTRAIL) ou non (oHSV-WT) avec une MOI de 1 pendant 72h et d'un traitement à l'ABT-737 (5 μ M) pendant 24h. Le graphique représente la moyenne de trois expériences indépendantes, avec les barres d'erreur standard à la moyenne. Chaque symbole représente la valeur d'un réplicat.

Bien qu'aucune condition n'entraîne une baisse statistiquement significative de la viabilité comparé aux cellules non traitées (100% de viabilité), une tendance semble se dessiner. Dans le graphique présenté ci-dessus, la viabilité décroît d'avantage lorsque l'infection est combinée à un traitement à l'ABT-737. L'infection seule avec oHSV-WT pCMV-sTRAIL n'induit qu'une diminution de 10% de la viabilité, contre 30% lorsque celle-ci est combinée à l'ABT-737. Notons que les résultats obtenus dans ces conditions varient considérablement d'une expérience à l'autre. Dans l'une des expériences (représentée par des triangles), la combinaison de l'infection et de l'ABT-737 entraîne une baisse de plus de 50% de la viabilité alors que chacun de ces traitements appliqué seul n'induit pratiquement aucune mort cellulaire. Il est également intéressant de noter qu'une tendance synergique semble aussi se dessiner entre l'ABT-737 et le virus non armé. Néanmoins, ces résultats ne permettent pas de mettre clairement en évidence une synergie entre l'infection par oHSV-WT pCMV-sTRAIL et l'ABT-737.

VI. DISCUSSION

Le glioblastome est la tumeur cérébrale la plus courante et la plus agressive, entraînant la mort d'une immense majorité des patients (environ 95%) dans les cinq ans qui suivent le diagnostic [4]. Cette issue dramatique est le reflet de traitements qui demeurent insuffisants, et particulièrement de la résistance observée face à ceux-ci. Ainsi, à ce jour, contourner cette résistance caractéristique du GBM mais également de nombreux autres cancers constitue l'un des objectifs majeurs pour améliorer la survie des patients [73][74]. C'est pourquoi l'utilisation d'un oHSV armé d'un transgène pour exprimer la forme soluble de TRAIL (sTRAIL) visant à détruire la population de cellules résistantes et activer une réponse immunitaire antitumorale s'avère intéressante [75].

1 EFFICACITÉ D'UN OHSV ARMÉ AVEC STRAIL SOUS LE CONTRÔLE DE PCMV

1.1 PRODUCTION DU TRANSGÈNE

Un virus oncolytique exprimant sTRAIL sous le contrôle du promoteur nestine (oHSV-WT pN-sTRAIL) ayant montré ses limites en partie dues à l'activation très variable de pN dans les cellules primaires de GBM (Figure 16), une variante de celui-ci dans laquelle le transgène a été placé sous le contrôle de pCMV, un promoteur fort, a été généré (oHSV-WT pCMV-sTRAIL). Après avoir produit, purifié et titré ce nouveau virus, nous avons pu évaluer sa capacité à sécréter sTRAIL lors d'une infection de cellules primaires de GBM, les GB138. Les résultats fournis par l'analyse ELISA ont confirmé que le transgène était correctement produit et sécrété par ces cellules.

Bien que nous espérions observer une production supérieure lorsque l'expression de sTRAIL est sous le contrôle de pCMV, cette analyse réalisée en parallèle sur le milieu de culture de cellules GB138 infectée par le virus oHSV-WT pN-sTRAIL a montré que la quantité de sTRAIL produite par les deux virus armés était plutôt semblable. En effet, la concentration de sTRAIL détectée suite à une infection avec l'un ou l'autre oHSV varie peu et oscille entre 320 et 430 pg/mL. Il est toutefois essentiel de rappeler que la production de sTRAIL avec oHSV-WT pN-sTRAIL est dépendante de l'expression de la nestine dans les cellules infectées, et par conséquent que l'avantage de la construction oHSV-WT pCMV-sTRAIL par rapport à oHSV-WT pN-sTRAIL varie entre plusieurs types cellulaires. Ainsi, si nous avons ici observé que l'expression de sTRAIL sous le contrôle de pCMV n'était pas plus

avantageuse dans les cellules GB138 dont le niveau d'expression de la nestine est inconnu, cela n'exclut pas que cette production soit considérablement augmentée en comparaison au oHSV-WT pN-sTRAIL dans une lignée où l'expression de la nestine est faible. La quantification de sTRAIL dans différentes lignées de cellules primaires infectées par chacun des virus oncolytiques permettrait de vérifier que lorsqu'il est sous contrôle de pCMV, le transgène varie moins d'une lignée de cellules primaires à l'autre et que la construction pCMV-sTRAIL présente un avantage sur pN-sTRAIL en particulier dans les cellules où l'expression de la nestine est plus faible.

1.2 INDUCTION DE L'APOPTOSE DANS UNE LIGNÉE DE GBM

Après avoir comparé la production de sTRAIL par les deux virus armés, nous avons comparé leur capacité à induire l'apoptose dans la lignée de GBM U87. Tout d'abord, les résultats indiquent que, quel que soit le promoteur utilisé pour contrôler l'expression de sTRAIL, l'armement induit efficacement l'apoptose dans cette lignée, contrairement à l'infection par le virus non armé. Ceci témoigne de la sensibilité des U87 à sTRAIL. En effet, le virus oHSV-WT seul n'induit pas d'augmentation significative du pourcentage de cellules apoptotiques évalué en cytométrie en flux contrairement aux deux virus armés qui provoquent une activation importante de l'apoptose. La raison pour laquelle un oHSV non armé n'induit pratiquement pas la mort cellulaire par apoptose pourrait être liée à la capacité d'HSV à interférer avec l'activation des caspases. Cette propriété est favorable à l'infection car elle permet d'échapper aux mécanismes de défense normalement mis en place par la cellule pour freiner la production de nouveaux virions. Ainsi, plusieurs protéines virales ont été décrites comme anti-apoptotiques, notamment les glycoprotéines gD et gJ, U_S3 et le transcrit impliqué dans la latence, LAT [76][77][30].

Les deux virus armés induisent l'apoptose des cellules U87 avec une efficacité similaire et le contrôle de l'expression de sTRAIL par le pCMV ne semble pas conférer un avantage dans celles-ci. Néanmoins, en regardant les images obtenues par le test Annexine V / DAPI en cytométrie en flux (Figure 18), nous pouvons observer une proportion plus importante de cellules en apoptose tardive après 72h d'infection avec oHSV-WT pCMV-sTRAIL qu'avec oHSV-WT pN-sTRAIL. On pourrait dès lors supposer que l'apoptose induite avec l'une ou l'autre construction est caractérisée par des cinétiques différentes qu'il serait intéressant de caractériser avec plus de précision.

De manière générale, les résultats apportés par les analyses ELISA et la cytométrie en flux indiquent que le nouveau virus armé oHSV-WT pCMV-sTRAIL induit la production du

transgène et que celui-ci est capable d'induire l'apoptose dans les cellules environnantes suite à sa liaison aux récepteurs DR4 et DR5. Dès lors, cette construction a pu être utilisée pour la suite des expériences.

1.3 INDUCTION DE L'APOPTOSE DANS DES CELLULES PRIMAIRES DE GBM

Nous avons ensuite poursuivi la caractérisation du oHSV-WT pCMV-sTRAIL en évaluant sa capacité à activer l'apoptose de cellules primaires de GBM. En effet, les glioblastomes présentent une très grande hétérogénéité, non seulement au sein des tumeurs elles-mêmes mais également d'un patient à l'autre. Ainsi, des cellules primaires obtenues à partir de résections chirurgicales (T033 et GB138, dans un premier temps), reflétant davantage des conditions réelles observées chez un patient ont été infectées et analysées en cytométrie en flux.

Les résultats obtenus sur les cellules primaires T033 et GB138 nous informent sur plusieurs éléments. Dans les T033, lorsqu'on s'intéresse au pourcentage moyen d'apoptose, celui-ci est légèrement plus élevé avec le virus non armé à 24, 48 et 72h. Cependant, la variabilité observée entre plusieurs expériences est importante et aucune différence n'est statistiquement significative. En ce qui concerne les GB138, bien qu'aucune analyse statistique n'ait pu être réalisée puisqu'une seule expérience est représentée, le pourcentage d'apoptose induite par le virus armé augmente au cours du temps, contrairement au virus non armé pour lequel ce pourcentage reste relativement constant, et est supérieure à celui observé pour le virus non armé après 72h d'infection. Notons tout de même qu'il est étonnant que nous observions un pourcentage plus important avec le virus non armé qu'avec le virus armé après 24h d'infection dans les deux types cellulaires. En effet, après un temps relativement court d'infection comme celui-ci, il est intuitif d'imaginer que l'impact de l'armement est négligeable et par conséquent que seule l'infection par oHSV a un effet sur le pourcentage d'apoptose. Puisque les cellules sont infectées avec une MOI de 1 dans les deux cas, on s'attendrait donc à observer une proportion d'apoptose similaire suite à l'infection par oHSV-WT ou oHSV-WT pCMV-sTRAIL. Une hypothèse plausible permettant d'expliquer ce décalage serait une imprécision des titres viraux présentés dans la figure S2b, pouvant mener à une sur- ou sous-estimation de la MOI réellement utilisée pour l'infection. Ensuite, nous pouvons également observer que les résultats obtenus sur les cellules primaires GB138 et T033 sont significativement différents de ceux obtenus sur la lignée U87 (Figure 19). En effet, alors que nous observions que le pourcentage d'apoptose induite par le virus non armé était significativement inférieur à celui obtenu avec oHSV-WT pCMV-sTRAIL après 72h

d'infection, ce constat n'a pas été établi dans les lignées primaires testées jusqu'à présent. Dans ces dernières, il semblerait que l'infection à elle seule enclenche également la voie de l'apoptose. Les observations réalisées sur la lignée U87 et sur les cellules primaires T033 et GB138 témoignent de la sensibilité variable de différentes lignées de GBM à TRAIL et à l'infection par un oHSV précédemment décrite dans la littérature [78].

Dans l'ensemble, bien que l'infection des T033 et des GB138 par le virus armé avec sTRAIL n'ait pas montré une activation de l'apoptose significativement plus importante qu'avec le virus non armé, il conviendrait de répéter cette expérience sur l'ensemble des cellules primaires disponibles au laboratoire afin d'évaluer leur sensibilité à l'infection par oHSV-WT pCMV-sTRAIL. De fait, plusieurs éléments sont susceptibles de faire varier l'efficacité de ce traitement. D'une part, le degré d'expression des récepteurs membranaires permettant l'entrée de HSV (principalement HVEM, nestine et 3-O-S HS) détermine la sensibilité des cellules à l'infection. D'autre part, le degré d'expression des récepteurs de TRAIL (DR4 et DR5) conditionne l'effet pro-apoptotique du virus armé sur les cellules environnantes. Ainsi, en parallèle de la mesure de l'apoptose en cytométrie en flux, il aurait été intéressant de (i) comparer l'expression de gènes viraux dans différentes lignées de GBM infectées afin d'évaluer leur susceptibilité à assurer la réplication virale, par exemple en réalisant une expérience de RT-qPCR et (ii) comparer le niveau d'expression des récepteurs DR4 et DR5 entre différentes lignées par mesure de cytométrie en flux pour évaluer leur sensibilité à TRAIL.

2 IMPACT DE L'ACTIVATION DE LA VOIE INTRINSÈQUE DE L'APOPTOSE

L'un des objectifs de ce mémoire était également de déterminer si l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose à l'aide d'un BH3-mimétique pouvait constituer une piste intéressante pour détruire les cellules de GBM. Si celle-ci s'avère efficace pour induire la mort cellulaire, nous pourrions à l'avenir utiliser cette propriété pour créer un nouveau virus armé, en introduisant une séquence codant pour un peptide BH3-mimétique [67]. Dans un premier temps, avant d'entamer une quelconque construction de virus oncolytique, l'impact de l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose a été évalué à l'aide de l'ABT-737, un BH3-mimétique synthétique facile d'utilisation [63].

Les différentes expériences réalisées sur les cellules primaires de GBM (évolution de la cytotoxicité et de la viabilité au cours du temps, doses-réponse et apoptose par cytométrie en flux) ont mis en évidence la capacité de l'ABT-737 à induire la mort cellulaire. Bien que ce BH3-mimétique entraîne une diminution de la viabilité dans l'ensemble des lignées testées, les valeurs d'IC₅₀ calculées pour chacune d'entre elles témoignent de leur sensibilité variable. Cet impact différentiel pourrait notamment s'expliquer par des degrés d'expression différents des protéines cibles de l'ABT-737 : Bcl-2, Bcl-X_L et Bcl-W. En effet, il se pourrait que le niveau de ces protéines anti-apoptotiques soient relativement faibles dans certaines lignées contrairement à d'autres protéines non ciblées, Mcl-1 par exemple, et par conséquent que l'ABT-737 seul ne permette pas d'induire la mort de manière importante dans celles-ci [59][79]. Les résultats obtenus dans le Western Blot réalisé sur des cellules GB138, par le biais du clivage de PARP-1, ont également validé l'activation de la signalisation de l'apoptose suite à un traitement à l'ABT-737. Cette activation s'est d'ailleurs montrée relativement rapide, comme l'atteste la présence de la forme clivée de PARP-1 déjà après 9h de traitement (Figure 24a). La voie intrinsèque n'a cependant jusqu'ici pas pu être mise en évidence par la quantité de cytochrome *c* présente dans la fraction mitochondriale. Quoi qu'il en soit, cette expérience doit nécessairement être répétée, probablement en adaptant la durée du traitement à l'ABT-737 pour assurer que l'analyse est bien réalisée pendant la fenêtre temporelle durant laquelle l'apoptose est en cours. En effet, selon *Susan Elmore*, les cellules peuvent passer par tous les stades d'apoptose en 2h seulement ; si l'expérience est réalisée trop tôt ou trop tard, il est possible d'obtenir des résultats faussement négatifs [43].

Dans l'ensemble, les résultats présentés dans ce mémoire permettent de valider le potentiel de l'inhibition des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 par un BH3-mimétique pour induire la mort par apoptose dans des cellules de GBM.

Bien que nous nous soyons focalisés sur l'activation de la voie intrinsèque par le biais d'un BH3-mimétique pour réprimer l'effet des protéines Bcl-2 anti-apoptotiques, d'autres régulateurs clés de cette voie auraient pu être ciblés. Tout comme les membres anti-apoptotiques de la famille protéique Bcl-2, les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs) sont d'autres régulateurs négatifs de la signalisation et sont, eux aussi, exprimés dans de nombreux cancers [80]. Leur expression contribue à la résistance thérapeutique en inhibant les caspases et est associée à un mauvais pronostic [81][82]. Le glioblastome n'y faisant pas exception, des études menées sur la lignée U87 ainsi que des cellules primaires ont montré l'expression de plusieurs IAPs dans celles-ci [83][84]. Ainsi, une autre approche visant à réprimer ces protéines à l'aide de « Smac-mimétiques », agonistes des protéines Smac (*Second*

mitochondria-derived activator of caspase) relarguées par la mitochondrie pendant l'apoptose, aurait également pu être abordée. En inhibant les IAPs, les Smac-mimétiques permettent de lever la répression exercée sur les caspases et par conséquent d'enclencher le reste de la cascade pro-apoptotique [80]. De cette manière, l'utilisation de Smac-mimétiques permettrait, tout comme les BH3-mimétiques, de lever la résistance observée face à d'autres traitements pro-apoptotiques, notamment le TMZ, les rayons gamma utilisés en radiothérapie et TRAIL [85][86][87].

3 TRAITEMENTS COMBINÉS : UNE POTENTIELLE SYNERGIE

Le troisième objectif de ce mémoire était d'évaluer le potentiel d'un traitement combiné, avec d'une part de l'infection par un oHSV armé avec sTRAIL (oHSV-WT pCMV-sTRAIL) capable d'activer la voie extrinsèque de l'apoptose et d'autre part d'un traitement à l'ABT-737 pour induire l'activation de la voie intrinsèque. Cette stratégie pourrait permettre de contourner la résistance à TRAIL de certaines cellules, notamment à cause de la surexpression de Bcl-2 [88][89]. Au cours des dernières années, beaucoup d'études se sont en effet penchées sur l'utilisation de traitements combinés avec TRAIL pour augmenter son efficacité en tant qu'agent antitumoral, notamment avec des inhibiteurs des IAPs, de la kinase CDK9 impliquée dans la prolifération tumorale ou des protéines Bcl-2 anti-apoptotiques [61][86]. En 2012, une équipe allemande avait mis en lumière la synergie résultante d'un co-traitement avec TRAIL et l'ABT-737 sur des cellules de GBM (lignées et cellules primaires), permettant d'induire les deux voies mais également de renforcer les connexions entre celles-ci et par conséquent induire une diminution considérable de la viabilité [64].

Dans le présent travail, la combinaison de l'infection des cellules GB138 par oHSV-WT pCMV-sTRAIL avec une MOI de 1 et du traitement à l'ABT-737 (5 μ M) n'a pas permis de mettre clairement en évidence une baisse statistiquement significative de la viabilité, comparé aux traitements uniques. Avant de développer plus amplement les résultats obtenus suite aux expériences de traitements combinés, il convient de discuter certains aspects concernant la méthode utilisée pour l'analyse. En effet, les résultats obtenus avec le test de viabilité utilisé dans ce travail et basé sur l'activité métabolique des cellules sont significativement différents de ce qui était observé en cytométrie en flux en ce qui concerne les infections virales. Pour les GB138, environ 30% des cellules sont considérées comme apoptotiques après 72h d'infection avec un oHSV non armé et ce nombre s'élève à 50% pour oHSV-WT pCMV-sTRAIL (Figure 20b). Selon le test de viabilité réalisé dans le cadre des traitements combinés,

ces pourcentages sont respectivement de 0% et 10% pour les mêmes conditions de traitement. Ces faibles pourcentages ne correspondent pas non plus à la morphologie des cellules infectées observées au microscope. Alors que les cellules primaires non traitées apparaissent comme des petites tumorosphères relativement compactes, les cellules infectées ainsi que les cellules contrôles traitées à la CPT apparaissent plutôt comme des amas diffus avec des cellules isolées et dispersées dans le puits, ce qui témoigne de la mort cellulaire induite dans celles-ci. La figure S8 des annexes représente des photos de cellules T033 non traitées, traitées à la CPT ou infectée avec l'un des oHSV ; le profil général est similaire dans les GB138. Sur base de ces observations, il semblerait que ce type de test basé sur l'activité métabolique des cellules en dosant la quantité d'ATP ne soit pas adapté pour mesurer l'impact d'une infection sur la viabilité cellulaire. En effet, étant donné les différents mécanismes mis en place par l'infection utilisant la machinerie cellulaire au service de la réplication virale ainsi que le relargage des nouveaux virions, par exemple, il ne serait pas étonnant que celle-ci impacte également certains mécanismes métaboliques et donc la quantité d'ATP cellulaire [28][31]. Outre ces suppositions, il a été précédemment décrit que la glycolyse était augmentée suite à une infection par HSV-1, entraînant une augmentation de quantité d'ATP contenue dans le cytoplasme des cellules infectées [90]. Cette observation permettrait d'expliquer les résultats obtenus pour le test de viabilité réalisés suite à l'infection avec oHSV-WT et oHSV-WT pCMV-sTRAIL : la quantité d'ATP étant augmentée au cours de l'infection, celle-ci ne permet pas d'obtenir une indication pertinente quant à la viabilité cellulaire. Il est tout à fait concevable que les cellules infectées soient caractérisées par un certain nombre de marqueurs apoptotiques (comme cela a d'ailleurs été démontré par cytométrie en flux et en Western Blot), mais que la quantité d'ATP ne reflète pas l'état physiologique de celles-ci. De ce fait, un autre type de mesure de viabilité et disponible sous forme de test en plaque 96-puits serait à privilégier pour étudier l'impact de traitements combinés basés sur une infection par un oHSV. Ainsi, bien que la cytométrie en flux constitue une méthode de choix pour l'analyse de l'apoptose induite par une infection virale, cette méthode requiert un nombre important de cellules et n'est dès lors pas adéquate pour ce type de test dans lequel les conditions testées sont relativement nombreuses. Le test de cytotoxicité, également utilisé pendant ce mémoire, basé sur le relargage de LDH lorsque l'intégrité de la membrane plasmique est affectée, risquerait également d'être biaisé pour évaluer la mort cellulaire suite à une infection par oHSV. En effet, la lactate déshydrogénase catalyse la conversion de pyruvate, produit final de la glycolyse, en lactate. Par conséquent, si la glycolyse est augmentée suite à une infection par HSV-1, la LDH pourrait également voir son expression augmenter pour transformer la quantité grandissante de pyruvate produite. D'autres tests métaboliques non basés sur la

quantité d'ATP couramment utilisés dans la littérature pour déterminer la viabilité cellulaire suite à une infection virale pourraient également être testés, par exemple le MTT ou la résazurine [91][92][93]. Un test alternatif non métabolique basé sur la mesure de l'activité d'une aminopeptidase, présente de manière constitutive et active dans les cellules viables, pourrait également être utilisé [91].

En ce qui concerne les résultats obtenus pour les traitements combinés, bien qu'aucune synergie n'ait été mise en évidence de manière significative, notons tout de même que le pourcentage de viabilité moyen pour les GB138 où l'infection par oHSV (armé ou non) est combiné à l'ABT-737 est inférieur à ce que l'on observe pour les traitements avec un seul agent (Figure 26). L'infection seule avec le virus non armé n'induit pas de diminution de la viabilité. Par contre, lorsqu'elle est combinée à l'ABT-737, le pourcentage de viabilité diminue d'environ 30%. En ce qui concerne la combinaison du virus armé avec l'ABT-737, on observe une diminution de 20% entre l'infection seule (90% de cellules viables) et celle combinée à l'ABT-737 (70%). Pour l'une des expériences, représentée par les triangles, nous pouvons néanmoins observer que le traitement combiné induit clairement une synergie.

Il convient également de rappeler qu'il s'agit ici des résultats de premières expériences obtenus sur un seul type cellulaire, devant être étendu aux autres lignées de GBM et dont les paramètres doivent sans doute être optimisés. Il faudrait notamment s'assurer que les concentrations utilisées sont adéquates. Selon les résultats obtenus par ELISA, la concentration de sTRAIL secrétée dans le milieu après 48h d'infection avec une MOI de 1 par oHSV-WT pCMV-sTRAIL dans des cellules GB138 s'élève à peu près à 400 pg/mL. Dans les articles qui combinent TRAIL et ABT-737, la concentration en TRAIL utilisée est certes variable entre différents types cellulaires de GBM, mais est généralement supérieure à 5 ng/mL [64][63]. Il convient donc de se demander si la quantité de sTRAIL produite par le virus armé dans ces conditions est suffisante pour déclencher une synergie entre les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose. Il se peut aussi qu'une MOI de 1 soit suffisante pour certains types cellulaires sensibles à TRAIL, notamment les U87 où l'infection par oHSV-WT pCMV-sTRAIL dans ces conditions entraîne l'apoptose dans la majorité des cellules (Figure 19), mais qu'une MOI plus importante soit nécessaire dans d'autres lignées de GBM qui y sont plus résistantes, comme les T033 qui expriment significativement moins DR5 en surface [37]. De futures mises au point permettront de déterminer si une infection avec une MOI plus forte doit être utilisée pour augmenter la concentration de sTRAIL au contact des cellules.

4 PERSPECTIVES

À l'issue du présent travail, plusieurs éléments ont été mis en lumière. Nous pouvons affirmer que la nouvelle construction oHSV-WT pCMV-sTRAIL induit une production efficace de la forme soluble de TRAIL et que celle-ci induit l'apoptose par la voie ligand-dépendante de manière significative dans la lignée de GBM U87. De plus, l'activation de l'apoptose par la voie mitochondriale à l'aide d'un BH3-mimétique s'est montrée efficace dans l'ensemble des cellules primaires issues de GBM testées. Bien qu'une potentielle synergie entre les deux voies n'ait pas pu être mise en évidence de manière claire à ce stade, elle ne peut être écartée.

Nous observons néanmoins qu'il subsiste un bon nombre d'interrogations auxquelles les réponses devront être apportées à l'aide de plusieurs mises au point mentionnées dans les paragraphes précédents (e.g. durée de traitement, MOI de l'infection pour un traitement combiné, type de test utilisé). De futures expériences sont nécessaires afin de confirmer le potentiel d'un traitement combiné basé sur un oHSV armé avec sTRAIL et l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose par un BH3-mimétique. De plus, la sécurité d'un traitement basé sur l'utilisation d'un virus oncolytique est également un aspect primordial à évaluer. Afin de nous assurer qu'un virus armé n'impacterait pas le tissu sain dans lequel est ancrée la tumeur, nous pourrions infecter des astrocytes avec oHSV-WT pCMV-sTRAIL et vérifier que ceci ne diminue pas leur viabilité, indiquant que la neurovirulence a bien été atténuée. Si, les résultats obtenus *in vitro* sur l'ensemble des cellules primaires de GBM sont encourageants et que le traitement est considéré sûr, l'étape suivante constituera à transposer ces résultats sur un modèle plus proche des tumeurs chez les patients, bien plus complexes.

Nous pourrions travailler avec des organoïdes, dans lesquels nous considérerions davantage l'hétérogénéité tumorale observée en clinique. En effet, bien que les tumorosphères utilisées durant ce mémoire soient intéressantes pour étudier le comportement des GSCs face aux différents traitements ainsi que la variabilité inter-tumorale, leur utilisation néglige les effets que peut avoir le microenvironnement tumoral face à ceux-ci. Parmi les avantages que représente l'utilisation d'organoïdes formés à partir de fragments tumoraux, nous pouvons citer : (i) conservation de l'architecture du tissu tumoral et d'une partie de son microenvironnement, (ii) conservation de l'hétérogénéité phénotypique et génotypique d'une tumeur, (iii) conservation de l'hétérogénéité cellulaire intra-tumorale [94].

Enfin, le passage vers un modèle murin constituerait une étape importante pour évaluer l'efficacité d'un traitement combiné *in vivo*. Dans cette optique, deux types de modèles

pourraient être étudiés afin d'évaluer l'efficacité de l'infection pour réduire la masse tumorale *in vivo*. D'une part, un modèle de xéno greffe dans lequel des cellules humaines de GBM sont introduites dans le cerveau de souris immunodéprimées permettrait de rendre compte de l'hétérogénéité qui apparaît entre des tumeurs d'origines différentes. D'autre part, un modèle murin dit « syngénique » permettrait quant à lui de considérer la réponse immunitaire induite par un oHSV armé. Ce type de modèle, résultant d'une greffe de cellules de GBM murines dans des souris immunocompétentes (par exemple la lignée GL261 dans laquelle la nectine est transduite pour permettre l'entrée d'oHSV), permet d'étudier l'efficacité du traitement ainsi que la contribution du système immunitaire de l'hôte, mais ne permet pas de prendre en compte l'hétérogénéité des glioblastomes. Cette approche est néanmoins intéressante pour évaluer l'activation d'une réponse immunitaire antitumorale faisant suite à l'infection par un oHSV armé.

RÉFÉRENCES

- [1] D. N. Louis *et al.*, “The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary,” *Neuro. Oncol.*, vol. 23, no. 8, pp. 1231–1251, 2021, doi: 10.1093/neuonc/noab106.
- [2] H. G. Wirsching, E. Galanis, and M. Weller, “Glioblastoma,” *Handb. Clin. Neurol.*, vol. 134, pp. 381–397, 2016, doi: 10.1016/B978-0-12-802997-8.00023-2.
- [3] M. E. Davis, “Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment.,” *Clin. J. Oncol. Nurs.*, vol. 20, no. 5 Suppl, pp. S2-8, Oct. 2016, doi: 10.1188/16.CJON.S1.2-8.
- [4] E. A. Maher and R. M. Bachoo, *Glioblastoma*. 2014.
- [5] S. Gritsch, T. T. Batchelor, and L. N. Gonzalez Castro, “Diagnostic, therapeutic, and prognostic implications of the 2021 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system.,” *Cancer*, vol. 128, no. 1, pp. 47–58, Jan. 2022, doi: 10.1002/cncr.33918.
- [6] A. D’Alessio, G. Proietti, G. Sica, and B. M. Scicchitano, “Pathological and molecular features of glioblastoma and its peritumoral tissue,” *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 4, 2019, doi: 10.3390/cancers11040469.
- [7] D. Henrik Heiland *et al.*, “Tumor-associated reactive astrocytes aid the evolution of immunosuppressive environment in glioblastoma,” *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, 2019, doi: 10.1038/s41467-019-10493-6.
- [8] S. Han *et al.*, “IDH mutation in glioma: molecular mechanisms and potential therapeutic targets,” *Br. J. Cancer*, vol. 122, no. 11, pp. 1580–1589, 2020, doi: 10.1038/s41416-020-0814-x.
- [9] H. Ohgaki and P. Kleihues, “The definition of primary and secondary glioblastoma.,” *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 19, no. 4, pp. 764–772, Feb. 2013, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3002.
- [10] N. Goffart, J. Kroonen, and B. Rogister, “Glioblastoma-initiating cells: Relationship with neural stem cells and the micro-environment,” *Cancers (Basel)*, vol. 5, no. 3, pp. 1049–1071, 2013, doi: 10.3390/cancers5031049.
- [11] A. Lombard, M. Digregorio, C. Delcamp, B. Rogister, C. Piette, and N. Coppieters,

- “The Subventricular Zone, a Hideout for Adult and Pediatric High-Grade Glioma Stem Cells,” *Front. Oncol.*, vol. 10, no. January, pp. 1–13, 2021, doi: 10.3389/fonc.2020.614930.
- [12] S. K. Carlsson, S. P. Brothers, and C. Wahlestedt, “Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme,” *EMBO Mol. Med.*, vol. 6, no. 11, pp. 1359–1370, 2014, doi: 10.15252/emmm.201302627.
- [13] M. E. Hegi *et al.*, “MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 352, no. 10, pp. 997–1003, 2005, doi: 10.1056/nejmoa043331.
- [14] X. Cai and M. E. Sughrue, “Glioblastoma: New therapeutic strategies to address cellular and genomic complexity,” *Oncotarget*, vol. 9, no. 10, pp. 9540–9554, 2018, doi: 10.18632/oncotarget.23476.
- [15] R. Duwa, F. Emami, S. Lee, J. H. Jeong, and S. Yook, “Polymeric and lipid-based drug delivery systems for treatment of glioblastoma multiforme,” *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 79, no. July, pp. 261–273, 2019, doi: 10.1016/j.jiec.2019.06.050.
- [16] X. Dong, “Current strategies for brain drug delivery,” *Theranostics*, vol. 8, no. 6, pp. 1481–1493, 2018, doi: 10.7150/thno.21254.
- [17] A. M. Coletti *et al.*, “Characterization of the ventricular-subventricular stem cell niche during human brain development,” *Dev.*, vol. 145, no. 20, 2018, doi: 10.1242/dev.170100.
- [18] N. Goffart *et al.*, “CXCL12 mediates glioblastoma resistance to radiotherapy in the subventricular zone,” *Neuro. Oncol.*, vol. 19, no. 1, pp. 66–77, 2017, doi: 10.1093/neuonc/now136.
- [19] N. Jahan *et al.*, “HHS Public Access,” vol. 141, no. 8, pp. 1671–1681, 2018, doi: 10.1002/ijc.30811.Therapeutic.
- [20] H. Fukuhara, Y. Ino, and T. Todo, “Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn,” *Cancer Sci.*, vol. 107, no. 10, pp. 1373–1379, 2016, doi: 10.1111/cas.13027.
- [21] P. Grandi, P. Peruzzi, B. Reinhart, J. B. Cohen, E. A. Chiocca, and J. C. Glorioso, “Design and application of oncolytic HSV vectors for glioblastoma therapy,” *Expert Rev. Neurother.*, vol. 9, no. 4, pp. 505–517, Apr. 2009, doi: 10.1586/ern.09.9.

- [22] H.-M. Nguyen and D. Saha, “The Current State of Oncolytic Herpes Simplex Virus for Glioblastoma Treatment,” *Oncolytic Virotherapy*, vol. Volume 10, pp. 1–27, 2021, doi: 10.2147/ov.s268426.
- [23] E. Ylösmäki and V. Cerullo, “Design and application of oncolytic viruses for cancer immunotherapy,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 65, pp. 25–36, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.11.016>.
- [24] L. Hofman, S. E. Lawler, and M. L. M. Lamfers, “The Multifaceted Role of Macrophages in Oncolytic Virotherapy.,” *Viruses*, vol. 13, no. 8, Aug. 2021, doi: 10.3390/v13081570.
- [25] L. Wang, L. S. Chard Dunmall, Z. Cheng, and Y. Wang, “Remodeling the tumor microenvironment by oncolytic viruses: beyond oncolysis of tumor cells for cancer treatment,” *J. Immunother. Cancer*, vol. 10, no. 5, p. e004167, 2022, doi: 10.1136/jitc-2021-004167.
- [26] J. Pol, G. Kroemer, and L. Galluzzi, “First oncolytic virus approved for melanoma immunotherapy.,” *Oncoimmunology*, vol. 5, no. 1, p. e1115641, 2016, doi: 10.1080/2162402X.2015.1115641.
- [27] C. Peters and S. D. Rabkin, “Designing herpes viruses as oncolytics,” *Mol. Ther. - Oncolytics*, vol. 2, no. March, p. 15010, 2015, doi: 10.1038/mto.2015.10.
- [28] M. K. Kukhanova, A. N. Korovina, and S. N. Kochetkov, “Human herpes simplex virus: Life cycle and development of inhibitors,” *Biochem.*, vol. 79, no. 13, pp. 1635–1652, 2014, doi: 10.1134/S0006297914130124.
- [29] M. I. Khalil, M. H. Sommer, J. Hay, W. T. Ruyechan, and A. M. Arvin, “Varicella-zoster virus (VZV) origin of DNA replication oriS influences origin-dependent DNA replication and flanking gene transcription,” *Virology*, vol. 481, pp. 179–186, 2015, doi: 10.1016/j.virol.2015.02.049.
- [30] A. Banerjee, S. Kulkarni, and A. Mukherjee, “Herpes Simplex Virus: The Hostile Guest That Takes Over Your Home,” *Front. Microbiol.*, vol. 11, no. May, pp. 1–18, 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.00733.
- [31] A. M. Agelidis and D. Shukla, “Cell entry mechanisms of HSV: What we have learned in recent years,” *Future Virol.*, vol. 10, no. 10, pp. 1145–1154, 2015, doi: 10.2217/fvl.15.85.

- [32] B. Grondin and N. DeLuca, “Herpes Simplex Virus Type 1 ICP4 Promotes Transcription Preinitiation Complex Formation by Enhancing the Binding of TFIID to DNA,” *J. Virol.*, vol. 74, no. 24, pp. 11504–11510, 2000, doi: 10.1128/jvi.74.24.11504-11510.2000.
- [33] J. D. Heming, J. F. Conway, and F. L. Homa, “Herpesvirus Capsid Assembly and DNA Packaging,” *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.*, vol. 223, pp. 119–142, 2017, doi: 10.1007/978-3-319-53168-7_6.
- [34] F. J. Ibáñez *et al.*, “Experimental dissection of the lytic replication cycles of herpes simplex viruses in vitro,” *Front. Microbiol.*, vol. 9, no. OCT, 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.02406.
- [35] K. Narayanan and Q. Chen, “Bacterial artificial chromosome mutagenesis using recombineering,” *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2011, 2011, doi: 10.1155/2011/971296.
- [36] Y. Li *et al.*, “ICP34.5 protein of herpes simplex virus facilitates the initiation of protein translation by bridging eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α) and protein phosphatase 1,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 28, pp. 24785–24792, 2011, doi: 10.1074/jbc.M111.232439.
- [37] J. Sanchez Gil, “Design and characterization of a CXCR4-retargeted and sTRAILarmed oncolytic HSV-1 to attack Glioblastoma stem-like cells (GSCs),” Université de Liège - ULiège > GIGA, 2022.
- [38] J. T. Cheng *et al.*, “Novel transcription regulatory sequences and factors of the immune evasion protein ICP47 (US12) of herpes simplex viruses,” *Virol. J.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–11, 2020, doi: 10.1186/s12985-020-01365-3.
- [39] P. Praest *et al.*, “The influence of TAP1 and TAP2 gene polymorphisms on TAP function and its inhibition by viral immune evasion proteins,” *Mol. Immunol.*, vol. 101, pp. 55–64, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.05.025>.
- [40] R. Kanai *et al.*, “Effect of γ 34.5 deletions on oncolytic herpes simplex virus activity in brain tumors,” *J. Virol.*, vol. 86, no. 8, pp. 4420–4431, Apr. 2012, doi: 10.1128/JVI.00017-12.
- [41] S. Suzuki, J. Namiki, S. Shibata, Y. Mastuzaki, and H. Okano, “The neural stem/progenitor cell marker nestin is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature,” *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.*, vol. 58,

- no. 8, pp. 721–730, Aug. 2010, doi: 10.1369/jhc.2010.955609.
- [42] J. Gil *et al.*, “Nanobody-based retargeting of an oncolytic herpesvirus for eliminating CXCR4+ GBM cells: A proof of principle,” *Mol. Ther. - Oncolytics*, vol. 26, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.omto.2022.06.002.
- [43] S. Elmore, “Apoptosis: a review of programmed cell death,” *Toxicol. Pathol.*, vol. 35, no. 4, pp. 495–516, Jun. 2007, doi: 10.1080/01926230701320337.
- [44] F. Gonzalez and A. Ashkenazi, “New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL,” *Oncogene*, vol. 29, no. 34, pp. 4752–4765, 2010, doi: 10.1038/onc.2010.221.
- [45] R. W. Birkinshaw and P. E. Czabotar, “The BCL-2 family of proteins and mitochondrial outer membrane permeabilisation,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 72, pp. 152–162, 2017, doi: 10.1016/j.semcdb.2017.04.001.
- [46] O. Julien and J. A. Wells, “Caspases and their substrates,” *Cell Death Differ.*, vol. 24, no. 8, pp. 1380–1389, 2017, doi: 10.1038/cdd.2017.44.
- [47] I. N. Lavrik, A. Golks, and P. H. Krammer, “Caspase: Pharmacological manipulation of cell death,” *J. Clin. Invest.*, vol. 115, no. 10, pp. 2665–2672, 2005, doi: 10.1172/JCI26252.
- [48] G. V. Chaitanya, J. S. Alexander, and P. P. Babu, “PARP-1 cleavage fragments: Signatures of cell-death proteases in neurodegeneration,” *Cell Commun. Signal.*, vol. 8, no. 1, p. 31, 2010, doi: 10.1186/1478-811X-8-31.
- [49] A. Peña-Blanco and A. J. García-Sáez, “Bax, Bak and beyond — mitochondrial performance in apoptosis,” *FEBS J.*, vol. 285, no. 3, pp. 416–431, 2018, doi: 10.1111/febs.14186.
- [50] K. Fernald and M. Kurokawa, “Evading apoptosis in cancer,” *Trends Cell Biol.*, vol. 23, no. 12, pp. 620–633, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.tcb.2013.07.006.
- [51] J. M. Adams and S. Cory, “The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets,” *Cell Death Differ.*, vol. 25, no. 1, pp. 27–36, 2018, doi: 10.1038/cdd.2017.161.
- [52] N. Fathi, G. Rashidi, A. Khodadadi, S. Shahi, and S. Sharifi, “STAT3 and apoptosis challenges in cancer,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 117, pp. 993–1001, 2018, doi:

10.1016/j.ijbiomac.2018.05.121.

- [53] S. Baig, I. Seevasant, J. Mohamad, A. Mukheem, H. Z. Huri, and T. Kamarul, “Potential of apoptotic pathway-targeted cancer therapeutic research: Where do we stand?,” *Cell Death Dis.*, vol. 7, no. 1, pp. e2058–e2058, 2016, doi: 10.1038/cddis.2015.275.
- [54] T. J. Sayers, “Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy,” *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 60, no. 8, pp. 1173–1180, 2011, doi: 10.1007/s00262-011-1008-4.
- [55] A. Montinaro *et al.*, “Potent pro-apoptotic combination therapy is highly effective in a broad range of cancers,” *Cell Death Differ.*, vol. 29, no. 3, pp. 492–503, 2022, doi: 10.1038/s41418-021-00869-x.
- [56] C. Falschlehner, C. H. Emmerich, B. Gerlach, and H. Walczak, “TRAIL signalling: Decisions between life and death,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 39, no. 7–8, pp. 1462–1475, 2007, doi: 10.1016/j.biocel.2007.02.007.
- [57] H. L. Ko and E. C. Ren, “Functional Aspects of PARP1 in DNA Repair and Transcription.,” *Biomolecules*, vol. 2, no. 4, pp. 524–548, Nov. 2012, doi: 10.3390/biom2040524.
- [58] A. Agarwal, R. Z. Mahfouz, R. K. Sharma, O. Sarkar, D. Mangrola, and P. P. Mathur, “Potential biological role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in male gametes,” *Reprod. Biol. Endocrinol.*, vol. 7, no. May 2014, 2009, doi: 10.1186/1477-7827-7-143.
- [59] G. Karpel-Massler, C. T. Ishida, Y. Zhang, M.-E. Halatsch, M.-A. Westhoff, and M. D. Siegelin, “Targeting intrinsic apoptosis and other forms of cell death by BH3-mimetics in glioblastoma,” *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 12, no. 10, pp. 1031–1040, Oct. 2017, doi: 10.1080/17460441.2017.1356286.
- [60] R. S. Soderquist and A. Eastman, “BCL2 inhibitors as anticancer drugs: A plethora of misleading BH3 mimetics,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 15, no. 9, pp. 2011–2017, 2016, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0031.
- [61] D. Merino, G. L. Kelly, G. Lessene, A. H. Wei, A. W. Roberts, and A. Strasser, “BH3-Mimetic Drugs: Blazing the Trail for New Cancer Medicines,” *Cancer Cell*, vol. 34, no. 6, pp. 879–891, 2018, doi: 10.1016/j.ccell.2018.11.004.
- [62] T. Oltersdorf *et al.*, “An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid

- tumours.,” *Nature*, vol. 435, no. 7042, pp. 677–681, Jun. 2005, doi: 10.1038/nature03579.
- [63] K. E. Tagscherer *et al.*, “Apoptosis-based treatment of glioblastomas with ABT-737, a novel small molecule inhibitor of Bcl-2 family proteins,” *Oncogene*, vol. 27, no. 52, pp. 6646–6656, 2008, doi: 10.1038/onc.2008.259.
- [64] S. Cristofanon and S. Fulda, “ABT-737 promotes tBid mitochondrial accumulation to enhance TRAIL-induced apoptosis in glioblastoma cells,” *Cell Death Dis.*, vol. 3, no. 11, pp. e432-11, 2012, doi: 10.1038/cddis.2012.163.
- [65] J. H. Song, K. Kandasamy, and A. S. Kraft, “ABT-737 induces expression of the death receptor 5 and sensitizes human cancer cells to TRAIL-induced apoptosis,” *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 36, pp. 25003–25013, 2008, doi: 10.1074/jbc.M802511200.
- [66] K. R. Roell, D. M. Reif, and A. A. Motsinger-Reif, “An introduction to terminology and methodology of chemical synergy-perspectives from across disciplines,” *Front. Pharmacol.*, vol. 8, no. APR, pp. 1–11, 2017, doi: 10.3389/fphar.2017.00158.
- [67] A. Letai, M. C. Bassik, L. D. Walensky, M. D. Sorcinelli, S. Weiler, and S. J. Korsmeyer, “Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics,” *Cancer Cell*, vol. 2, no. 3, pp. 183–192, 2002, doi: 10.1016/S1535-6108(02)00127-7.
- [68] J. A. Sánchez-Alcázar, J. G. Ault, A. Khodjakov, and E. Schneider, “Increased mitochondrial cytochrome c levels and mitochondrial hyperpolarization precede camptothecin-induced apoptosis in Jurkat cells,” *Cell Death Differ.*, vol. 7, no. 11, pp. 1090–1100, Nov. 2000, doi: 10.1038/sj.cdd.4400740.
- [69] C.-W. Zeng *et al.*, “Camptothecin Induces Apoptosis in Cancer Cells via MicroRNA-125b-Mediated Mitochondrial Pathways,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 81, no. 4, pp. 578–586, 2012, doi: 10.1124/mol.111.076794.
- [70] A. L. Bodley and T. A. Shapiro, “Molecular and cytotoxic effects of camptothecin, a topoisomerase I inhibitor, on trypanosomes and Leishmania.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 9, pp. 3726–3730, Apr. 1995, doi: 10.1073/pnas.92.9.3726.
- [71] K. E. Tagscherer, A. Fassel, B. Campos, M. Farhadi, A. Kraemer, and B. C. Bo, “Apoptosis-based treatment of glioblastomas with ABT-737, a novel small molecule inhibitor of Bcl-2 family proteins,” pp. 6646–6656, 2008, doi: 10.1038/onc.2008.259.

- [72] M. P. Kline *et al.*, “ABT-737, an inhibitor of Bcl-2 family proteins, is a potent inducer of apoptosis in multiple myeloma cells,” *Leukemia*, vol. 21, no. 7, pp. 1549–1560, 2007, doi: 10.1038/sj.leu.2404719.
- [73] N. Vasan, J. Baselga, and D. M. Hyman, “A view on drug resistance in cancer,” *Nature*, vol. 575, no. 7782, pp. 299–309, 2019, doi: 10.1038/s41586-019-1730-1.
- [74] J. Zugazagoitia, C. Guedes, S. Ponce, I. Ferrer, S. Molina-Pinelo, and L. Paz-Ares, “Current Challenges in Cancer Treatment,” *Clin. Ther.*, vol. 38, no. 7, pp. 1551–1566, Jul. 2016, doi: 10.1016/j.clinthera.2016.03.026.
- [75] N. Jahan, J. M. Lee, K. Shah, and H. Wakimoto, “Therapeutic targeting of chemoresistant and recurrent glioblastoma stem cells with a proapoptotic variant of oncolytic herpes simplex virus,” *Int. J. cancer*, vol. 141, no. 8, pp. 1671–1681, Oct. 2017, doi: 10.1002/ijc.30811.
- [76] X. Yu and S. He, “The interplay between human herpes simplex virus infection and the apoptosis and necroptosis cell death pathways,” *Virol. J.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–8, 2016, doi: 10.1186/s12985-016-0528-0.
- [77] K. R. Jerome, R. Fox, Z. Chen, A. E. Sears, H. y Lee, and L. Corey, “Herpes simplex virus inhibits apoptosis through the action of two genes, Us5 and Us3,” *J. Virol.*, vol. 73, no. 11, pp. 8950–8957, Nov. 1999, doi: 10.1128/JVI.73.11.8950-8957.1999.
- [78] K. Tamura *et al.*, “Multimechanistic tumor targeted oncolytic virus overcomes resistance in brain tumors,” *Mol. Ther.*, vol. 21, no. 1, pp. 68–77, 2013, doi: 10.1038/mt.2012.175.
- [79] T. Noll, S. Schultze-Seemann, I. Kuckuck, M. Michalska, and P. Wolf, “Synergistic cytotoxicity of a prostate cancer-specific immunotoxin in combination with the BH3 mimetic ABT-737,” *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 67, Mar. 2018, doi: 10.1007/s00262-017-2097-5.
- [80] L. Dubrez, J. Berthelet, and V. Glorian, “IAP proteins as targets for drug development in oncology,” *Oncol. Targets. Ther.*, vol. 6, pp. 1285–1304, 2013, doi: 10.2147/OTT.S33375.
- [81] Y. Nakagawa *et al.*, “IAP family protein expression correlates with poor outcome of multiple myeloma patients in association with chemotherapy-induced overexpression of multidrug resistance genes,” *Am. J. Hematol.*, vol. 81, no. 11, pp. 824–831, Nov.

2006, doi: 10.1002/ajh.20656.

- [82] X. Che *et al.*, “Nuclear cIAP1 overexpression is a tumor stage- and grade-independent predictor of poor prognosis in human bladder cancer patients.,” *Urol. Oncol.*, vol. 30, no. 4, pp. 450–456, 2012, doi: 10.1016/j.urolonc.2010.12.016.
- [83] A. Tchoghandjian *et al.*, “Inhibitor of apoptosis protein expression in glioblastomas and their in vitro and in vivo targeting by SMAC mimetic GDC-0152,” *Cell Death Dis.*, vol. 7, no. 8, 2016, doi: 10.1038/cddis.2016.214.
- [84] A. Soubéran *et al.*, “Inhibitor of Apoptosis Proteins Determines Glioblastoma Stem-Like Cell Fate in an Oxygen-Dependent Manner,” *Stem Cells*, vol. 37, no. 6, pp. 731–742, Jun. 2019, doi: 10.1002/stem.2997.
- [85] R. Berger *et al.*, “NF- κ B is required for Smac mimetic-mediated sensitization of glioblastoma cells for γ -irradiation-induced apoptosis.,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 10, no. 10, pp. 1867–1875, Oct. 2011, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0218.
- [86] L. Wagner *et al.*, “Smac mimetic sensitizes glioblastoma cells to Temozolomide-induced apoptosis in a RIP1- and NF- κ B-dependent manner.,” *Oncogene*, vol. 32, no. 8, pp. 988–997, Feb. 2013, doi: 10.1038/onc.2012.108.
- [87] S. Fulda, W. Wick, M. Weller, and K.-M. Debatin, “Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo,” *Nat. Med.*, vol. 8, no. 8, pp. 808–815, 2002, doi: 10.1038/nm735.
- [88] J. Rieger, U. Naumann, T. Glaser, A. Ashkenazi, and M. Weller, “APO2 ligand: a novel lethal weapon against malignant glioma?,” *FEBS Lett.*, vol. 427, no. 1, pp. 124–128, May 1998, doi: 10.1016/s0014-5793(98)00409-8.
- [89] S. Fulda, E. Meyer, and K.-M. Debatin, “Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression,” *Oncogene*, vol. 21, no. 15, pp. 2283–2294, 2002, doi: 10.1038/sj.onc.1205258.
- [90] J. L. Abrantes *et al.*, “Herpes simplex type 1 activates glycolysis through engagement of the enzyme 6-phosphofructo-1-kinase (PFK-1),” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, vol. 1822, no. 8, pp. 1198–1206, 2012, doi: 10.1016/j.bbadis.2012.04.011.
- [91] T. L. Riss *et al.*, “Cell Viability Assays.,” S. Markossian, A. Grossman, K.

Brimacombe, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, J. Baell, T. D. Y. Chung, N. P. Coussens, J. L. Dahlin, V. Devanarayan, T. L. Foley, M. Glicksman, J. V Haas, M. D. Hall, S. Hoare, J. Inglese, P. W. Iversen, S. C. Kales, M. Lal-Nag, Z. Li, J. McGee, O. McManus, T. Riss, P. Saradjian, G. S. Sittampalam, M. Tarselli, O. J. J. Trask, Y. Wang, J. R. Weidner, M. J. Wildey, K. Wilson, M. Xia, and X. Xu, Eds. Bethesda (MD), 2004.

- [92] J. A. Müller *et al.*, “Development of a high-throughput colorimetric Zika virus infection assay.,” *Med. Microbiol. Immunol.*, vol. 206, no. 2, pp. 175–185, Apr. 2017, doi: 10.1007/s00430-017-0493-2.
- [93] D. J. M. Cruz *et al.*, “Identification of novel compounds inhibiting chikungunya virus-induced cell death by high throughput screening of a kinase inhibitor library.,” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 7, no. 10, p. e2471, 2013, doi: 10.1371/journal.pntd.0002471.
- [94] E. Klein, A. C. Hau, A. Oudin, A. Golebiewska, and S. P. Niclou, “Glioblastoma Organoids: Pre-Clinical Applications and Challenges in the Context of Immunotherapy,” *Front. Oncol.*, vol. 10, no. December, pp. 1–18, 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.604121.
- [95] Biologydictionary.net Editors. (2017, June 06). Apoptosis. Retrieved from <https://biologydictionary.net/apoptosis/>

ANNEXES

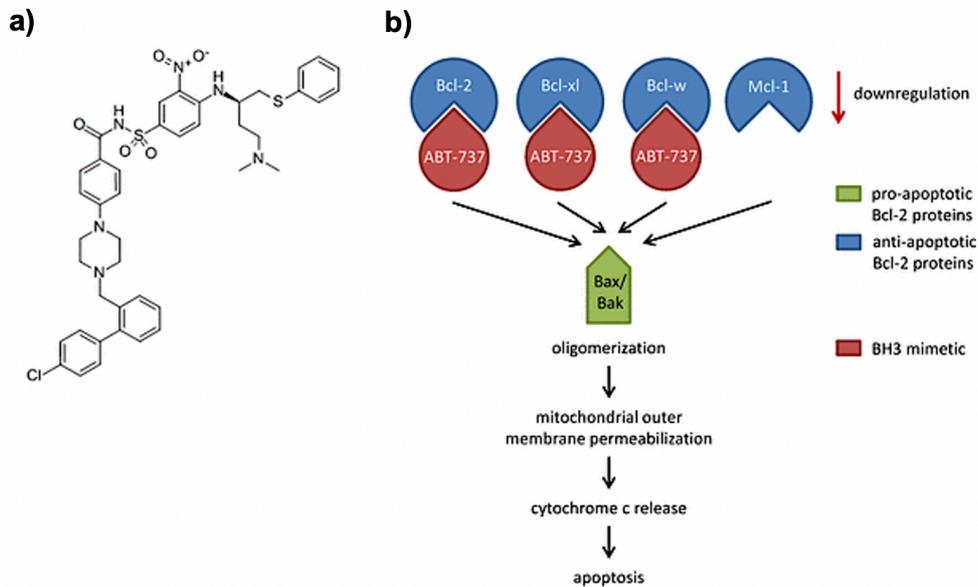


Figure S1. Représentation schématique du mécanisme d'action du BH3-mimétique ABT-737. a) Structure moléculaire. b) Inhibition des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-X_L et Bcl-W induisant l'oligomérisation de Bax et Bak, la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et la libération de cytochrome c conduisant à l'apoptose. Adapté à partir de [79].

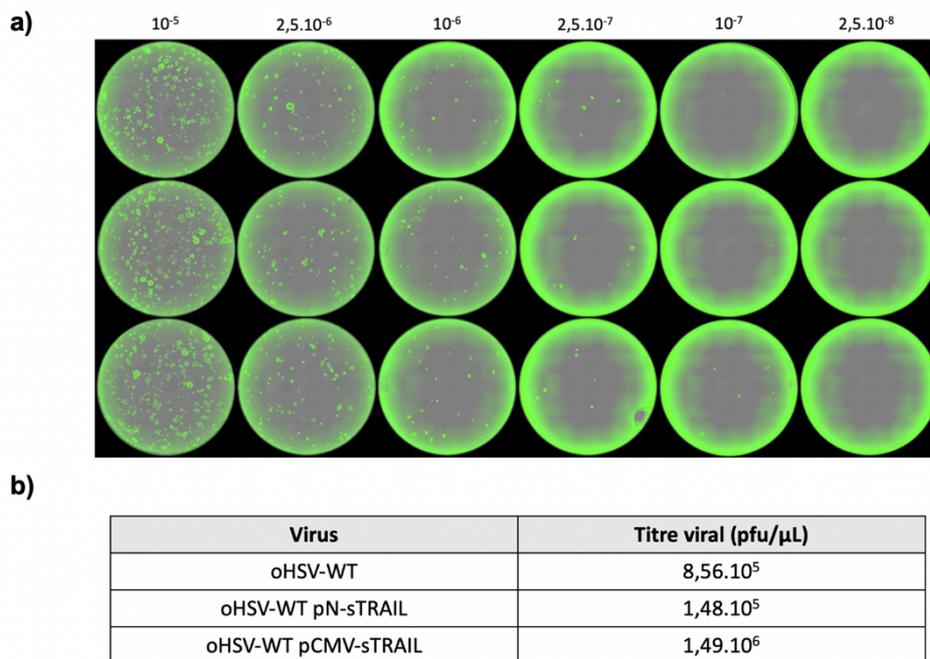


Figure S2. Titration virale. a) Résultats de la titration du virus oHSV-WT pCMV-sTRAIL, photo des foyers d'infections. Image prise par l'IncuCyte® après 48h d'infection à partir de plusieurs dilutions du stock de virus. b) Tableau récapitulatif des titres viraux utilisés dans ce mémoire.

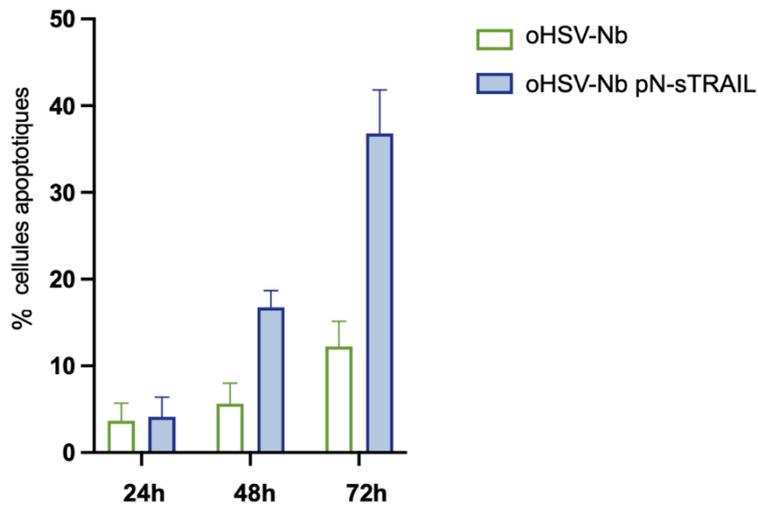


Figure S3. Efficacité de l'armement d'oHSV avec sTRAIL sur la lignée U87 CXCR4+. Histogramme représentant les résultats de cytométrie en flux après 24h, 48h et 72h d'infection par le virus retargeté oHSV-Nb et retargeté et armé oHSV-Nb pN-sTRAIL (Judith Sanchez Gil).

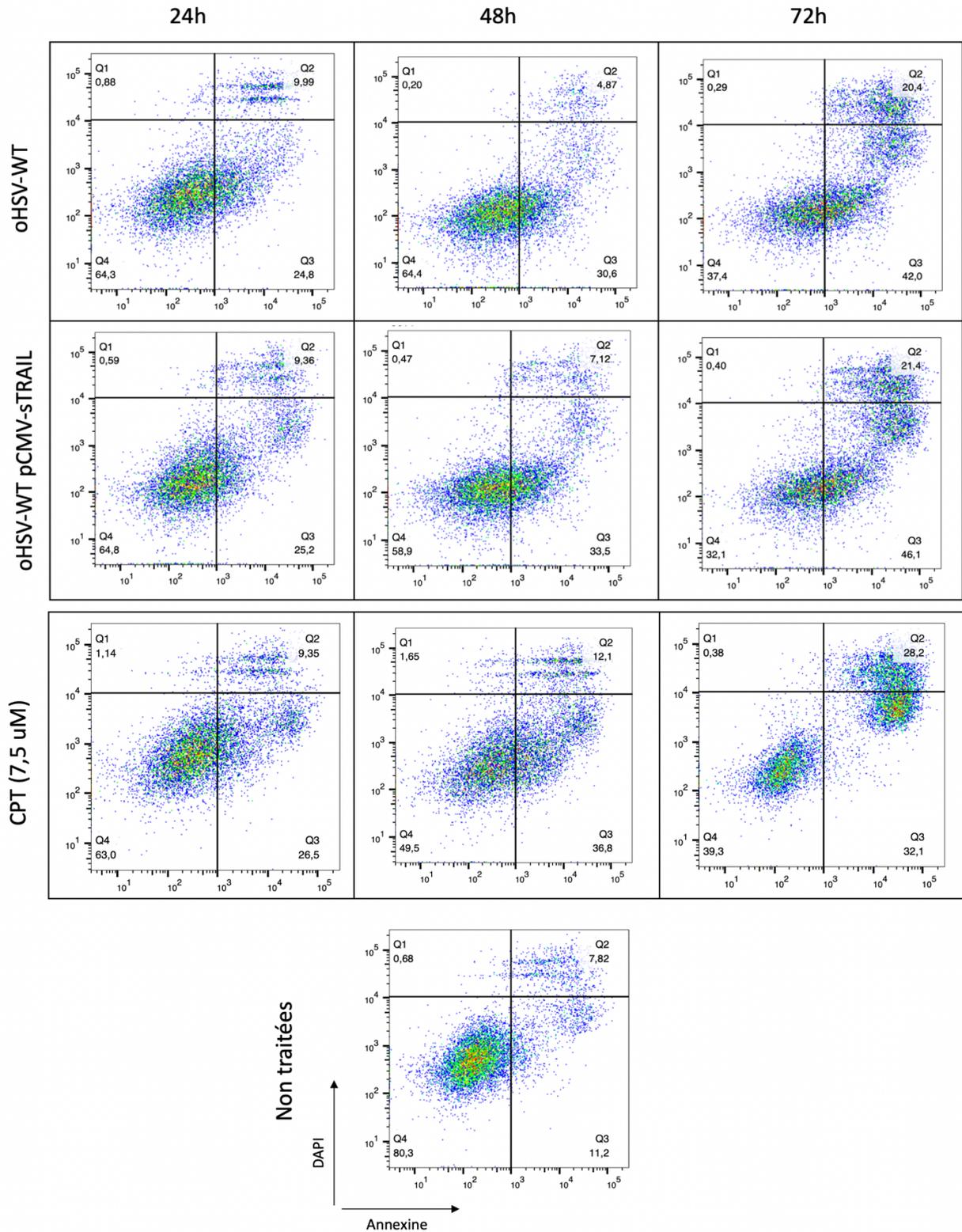


Figure S4. Évaluation par cytométrie en flux de l'apoptose induite sur des T033 par une infection de 24h, 48h ou 72h par un oHSV armé ou non avec sTRAIL (MOI de 1). Le traitement à la CPT (7.5 μ M) sert de contrôle positif, les cellules non traitées (72h d'incubation) de contrôle négatif. Résultats d'une expérience représentative.

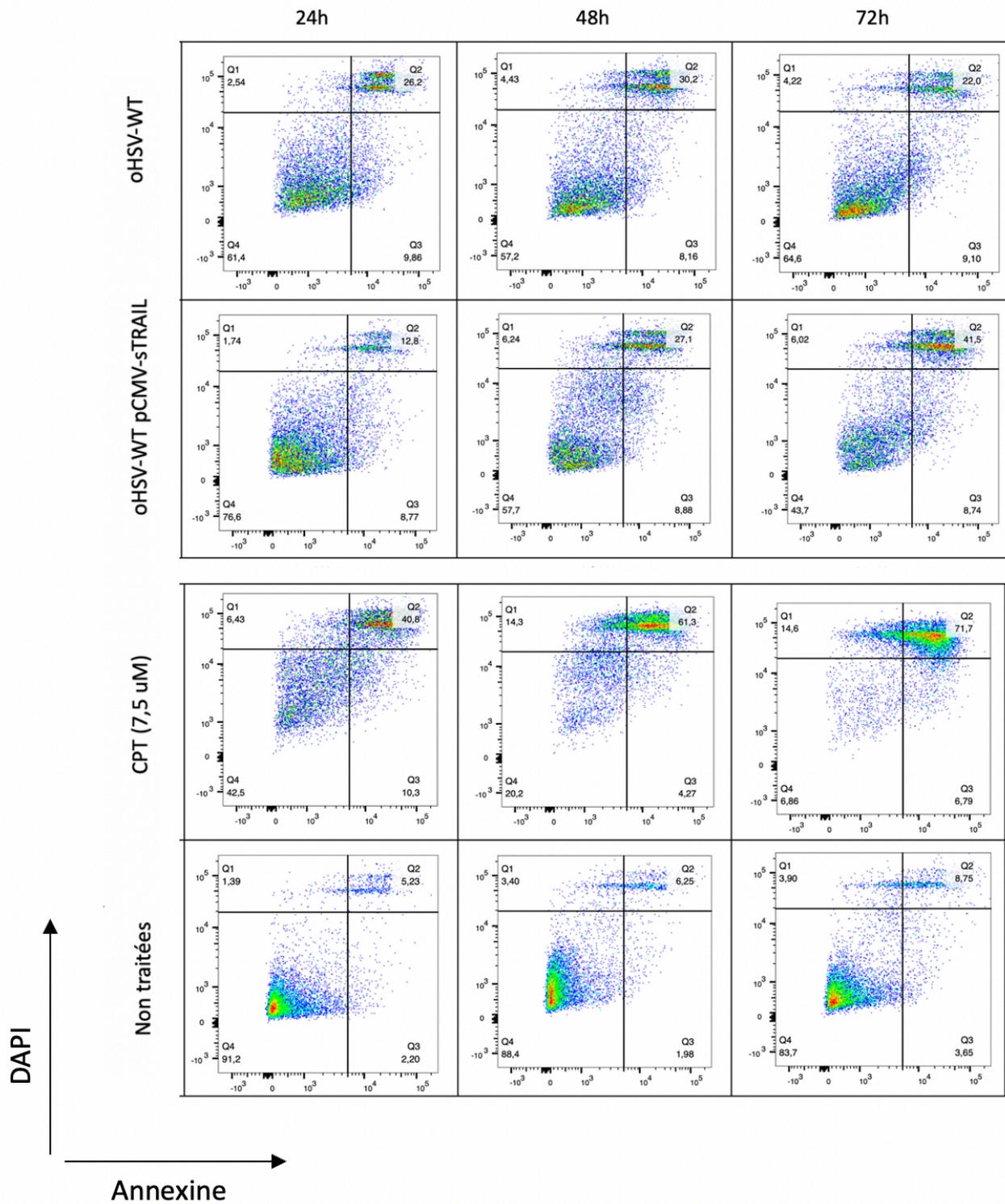


Figure S5. Évaluation par cytométrie en flux de l'apoptose induite sur des GB138 par une infection de 24h, 48h ou 72h par un oHSV armé ou non avec sTRAIL (MOI de 1). Le traitement à la CPT (7.5 μ M) sert de contrôle positif, les cellules non traitées de contrôle négatif. Résultats de l'unique réplicat pour cette l'expérience.

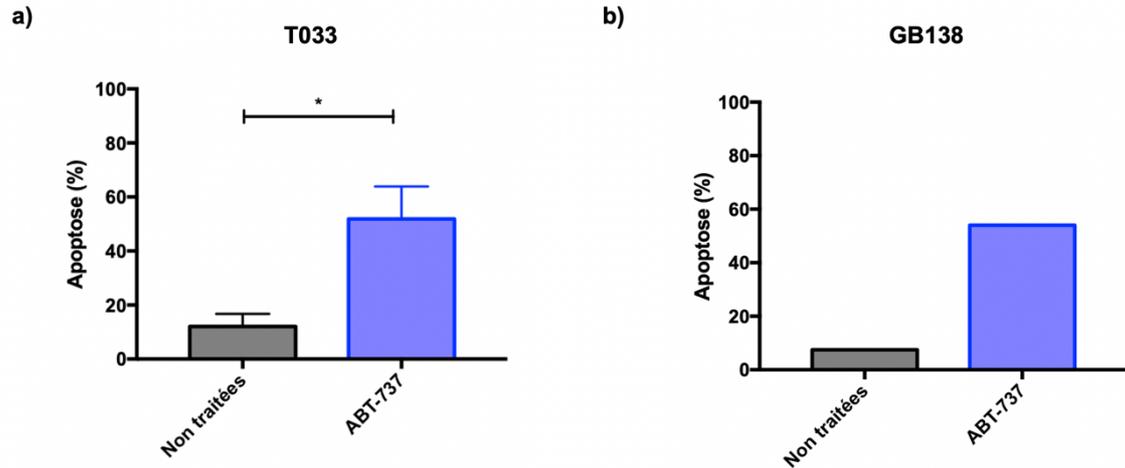


Figure S6. Pourcentage d'apoptose détecté par cytométrie en flux (test Annexine V / DAPI) dans les cellules T033 (a) et GB138 (b) après 24h de traitement avec 10 μ M d'ABT-737. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes pour les T033, avec les barres d'erreurs standard à la moyenne et le résultat d'une unique expérience sur les GB138. Les cellules non traitées servent de contrôle négatif. Test de Student, * = p -valeur < 0.05.

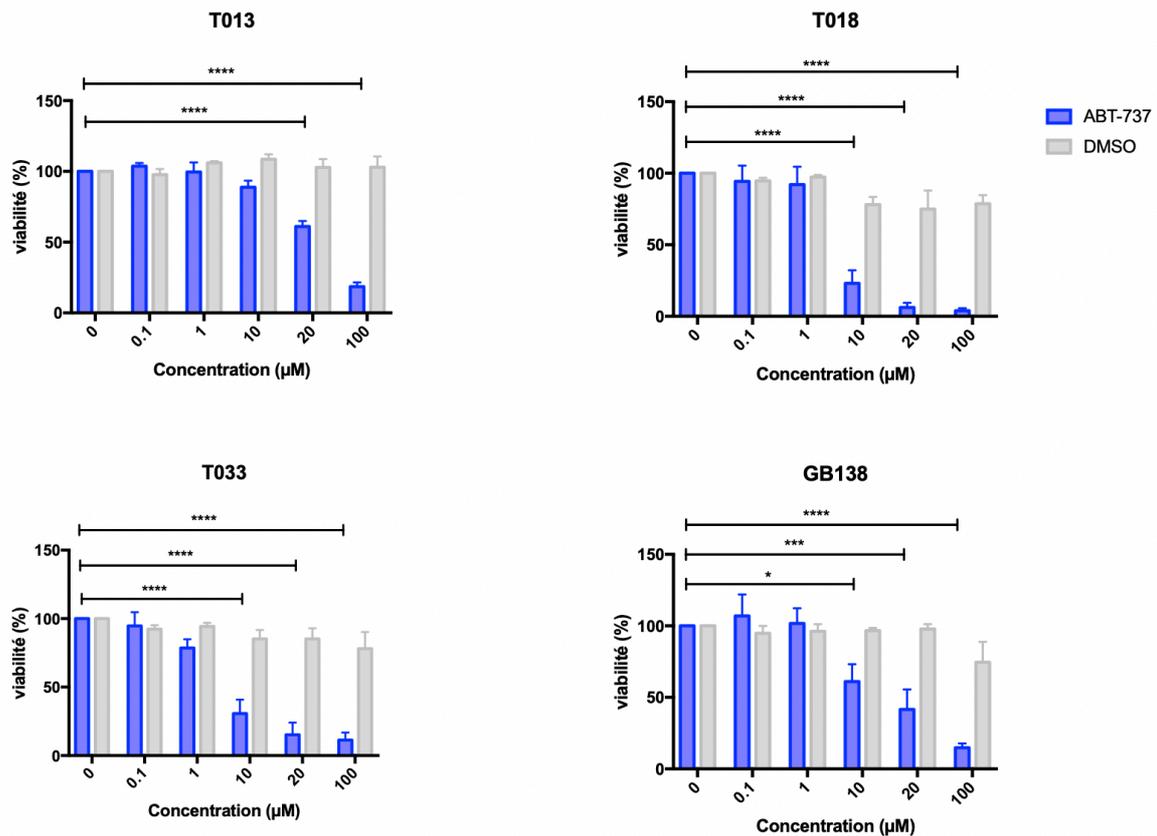


Figure S7. Résultat des expériences de dose-réponse pour un traitement à l'ABT-737. Pour chacune des quatre lignées primaires (T013, T018, T033 et GB138), trois expériences indépendantes ont été réalisées avec des concentrations croissantes en ABT-737. Le DMSO sert de contrôle négatif. Two-way ANOVA, * = $p < 0.05$, *** = $p < 0.001$ et **** = $p < 0.0001$.

T033

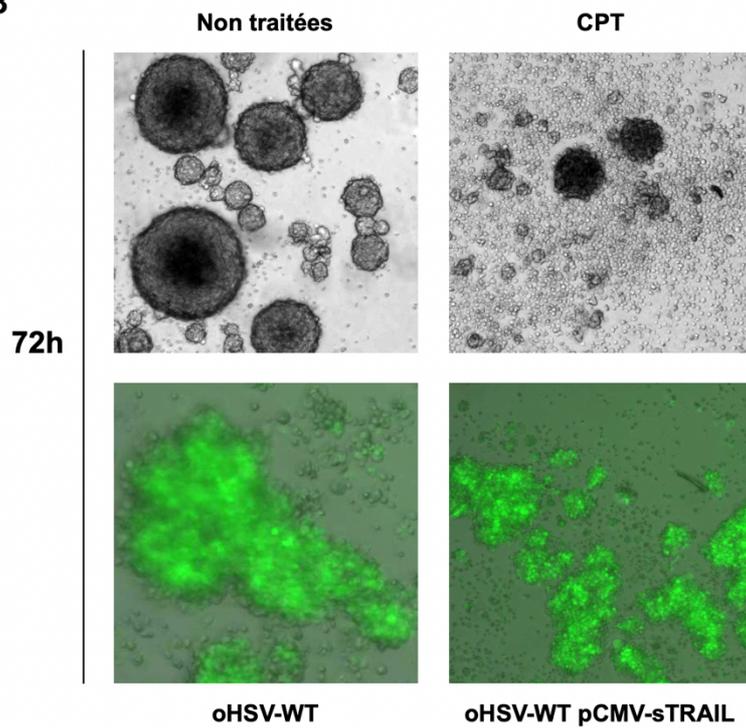


Figure S8. Morphologie de cellules T033 infectées. Les cellules cultivées en tumorosphères ont été traitées avec de la camptothécine (CPT, 7.5 μ M) ou infectées par un virus armé ou non avec sTRAIL (MOI de 1) pendant 72h. Les infections sont mises en évidence par l'expression de la GFP. Images obtenues au microscope à fluorescence, grossissement 10x.

OPTIMISATION D'UN TRAITEMENT COMBINÉ BASÉ SUR UN OHSV ARMÉ POUR LA THÉRAPIE DU GLIOBLASTOME

Le glioblastome est le type de tumeur cérébrale le plus agressif et le plus fréquent. Actuellement, le traitement standard repose sur une résection maximale de la masse tumorale, suivie de radio- et/ou de chimiothérapie. Malgré cela, l'espérance de vie médiane des patients demeure d'à peine plus d'un an. Cette issue fatale s'explique par la résurgence systématique de la tumeur, dont des cellules aux propriétés de cellules souches sont responsables. La résistance de ces dernières aux traitements précités s'explique notamment par des altérations de la voie de signalisation de l'apoptose, conduisant à un destin anti-apoptotique favorisant la prolifération tumorale. Ainsi, de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à cibler et détruire spécifiquement ces cellules sont recherchées. Parmi elles, l'utilisation d'un virus de l'herpès simplex oncolytique (oHSV) armé avec un transgène pro-apoptotique, seul ou combiné avec d'autres activateurs de l'apoptose, s'est montrée prometteuse.

Pendant ce mémoire, un oHSV armé avec la forme soluble de TRAIL (sTRAIL) placée sous le contrôle du promoteur fort CMV a été caractérisé concernant sa capacité à induire la voie ligand-dépendante de l'apoptose dans plusieurs lignées primaires de glioblastome. En parallèle, l'efficacité de l'ABT-737, un BH3-mimétique capable d'induire la voie mitochondriale de l'apoptose, a également été évaluée. Enfin, un traitement combiné avec le oHSV armé et l'ABT-737 a été testé afin de déterminer si la stimulation simultanée des deux voies de l'apoptose entraînerait un effet synergique.

Le virus armé dans lequel sTRAIL est placé sous le contrôle du promoteur CMV permet de sécréter sTRAIL dans le milieu extracellulaire, ainsi que d'activer l'apoptose dans plusieurs lignées de glioblastome. L'efficacité de l'armement s'est montrée variable entre différents types cellulaires, induisant l'apoptose de manière significativement plus importante qu'un oHSV non armé dans la lignée U87 et n'étant que peu avantageux par rapport à celui-ci dans deux lignées primaires (GB138 et T033). Le traitement avec l'ABT-737 a quant à lui entraîné une diminution de la viabilité dans l'ensemble des lignées testées (T013, T018, T033 et GB138), de manière variable également. Bien qu'un impact plus important ait été mis en évidence lorsque ces deux traitements sont combinés, des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer la présence d'un effet synergique.

La sensibilité variable des cellules à l'infection par oHSV, à sTRAIL et à l'ABT-737 mises en évidence dans ce travail témoigne de l'hétérogénéité intra- et intertumorale du glioblastome. La résistance observée face à l'un ou l'autre traitement met en lumière l'intérêt d'un traitement combiné qui doit être optimisé davantage.