

Preuve de principe de l'utilisation de virus HSV oncolytique "ciblé" et "armé" pour induire l'apoptose de manière ciblée dans des glioblastomes.

Auteur : Collignon, Alice

Promoteur(s) : Sadzot, Catherine

Faculté : Faculté des Sciences

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

Année académique : 2017-2018

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/5429>

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

Laboratoire de Virologie et d'Immunologie

Promoteur : Professeur C. Sadzot-Delvaux



**Preuve de principe de l'utilisation de virus HSV oncolytique
« ciblé » et « armé » pour induire l'apoptose de manière
ciblée dans des glioblastomes.**



Mémoire présenté par

COLLIGNON Alice

En vue de l'obtention du grade de « Master en Biochimie et Biologie
Moléculaire et Cellulaire » à finalité approfondie

Année académique 2017-2018

Source image de couverture : <https://www.outerplaces.com/science/item/18653-herpes-virus-alzheimers-disease>

Université de Liège

Faculté des Sciences

Département des Sciences de la vie

Laboratoire de Virologie et d'Immunologie

Promoteur : Professeur C. Sadzot-Delvaux

**Preuve de principe de l'utilisation de virus HSV
oncolytique « ciblé » et « armé » pour induire
l'apoptose de manière ciblée dans des
glioblastomes.**

Mémoire présenté par

COLLIGNON Alice

En vue de l'obtention du grade de « Master en Biochimie et Biologie
Moléculaire et Cellulaire » à finalité approfondie

Année académique 2017-2018

REMERCIEMENTS

J'adresse tout d'abord mes remerciements au Professeur Catherine Sadzot-Delvaux pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de virologie - immunologie et pour m'avoir permis (enfin) d'y réaliser mon mémoire. Je la remercie particulièrement pour ses conseils ainsi que pour son implication, sa disponibilité et sa bienveillance tout au long de cette année.

Ensuite, je remercie très chaleureusement mon encadrante Judith Sanchez Gil pour tous ses bons conseils, recommandations et son optimisme sans faille. Elle fut pour moi une grande source d'énergie et de motivation, merci de m'avoir reboostée dans mes « petits » moments de doute. Je remercie également Marielle Lebrun pour ses petites astuces, ses explications éclairées et sa bonne humeur. J'adresse également un merci à Julien Lambert pour sa patience à mes côtés, son humanité légendaire et son grand altruisme .

Un tout grand merci également à l'ensemble des membres du laboratoire de virologie ainsi qu'à ceux de la plateforme « Viral Vectors » et du laboratoire « PSI ». Leur bonne humeur ainsi que leur humour m'ont permis de passer une année extraordinaire.

J'étends mes remerciements à ma famille, qui m'a soutenue tout au long de mes études ainsi qu'à Jérôme qui m'a encouragée et qui a bien dû me supporter durant cette année.

Enfin, les derniers mais pas les moindres, je remercie mes amis Sinaeda et Jordan dont l'aide et la présence m'ont sans nul doute été nécessaire pour arriver jusqu'à ce stade.

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	I
Liste des figures et tables.....	V
Liste des abréviations.....	VI
I. INTRODUCTION.....	1
1 Le glioblastome multiforme.....	1
2 Des cellules souches cancéreuses.....	1
2.1 Les marqueurs des CSCs.....	1
2.2 L'importance de la zone sous-ventriculaire.....	2
2.3 Les chimiokines.....	2
2.4 La chimiokine CXCL12.....	2
2.5 Le récepteur CXCR4.....	3
3 La nestine.....	4
3.1 Un promoteur nestin.....	4
4 Les nouvelles thérapies.....	5
4.1 Une nouvelle arme contre le cancer : les virus oncolytiques.....	5
4.2 Un herpes virus oncolytique.....	5
4.3 HSV-1.....	6
5 Induire la mort cellulaire.....	8
5.1 TRAIL pour induire l'apoptose.....	8
5.2 Les récepteurs de TRAIL.....	9
5.3 Voie de signalisation médiée par TRAIL.....	10
II. OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	12
III. MATERIEL.....	13
1 Lignées cellulaires.....	13
1.1. Cellules HEK293T Lx1B4.....	13
1.2. Cellules U87 CXCR4 ⁺ nih2.....	13
1.3. Cellules LN18.....	13
1.4. Cellules T98G.....	13
1.5. Cellules HADF.....	13
2. Plasmides lentiviraux utilisés.....	14
3. Tampons.....	14
3.1. Tampon de lyse RIPA.....	14
3.2. Tampon de migration.....	14
3.3. Tampon de transfert.....	15
3.4. Tampon de chargement.....	15

3.5.	PBS	15
3.6.	TBS.....	15
3.7.	TAE	15
4.	Milieus.....	15
4.1.	Milieu M9.....	15
4.2.	Milieu minimal M63.....	15
4.3.	Milieu LB.....	16
5.	Gel de polyacrylamide	16
6.	Anticorps utilisés.....	16
7.	Oligonucléotides utilisés.....	16
IV.	METHODES.....	17
1.	Maxipréparation de plasmide.....	17
2.	Production de particules lentivirales de seconde génération	18
2.1.	Transfection	18
2.2.	Concentration et titration des particules virales	18
3.	Transduction	18
4.	Analyse de la viabilité au bleu de trypan	18
5.	<i>Western blotting</i>	19
5.1.	Lyse cellulaire (extraits totaux)	19
5.2.	Chargement, migration et révélation	19
6.	Immunofluorescence	19
7.	Réaction en chaîne par polymérase (<i>Polymerase Chain Reaction</i> ; PCR)	20
8.	Electrophorèse sur gel d'agarose.....	20
9.	Génération de bacmides recombinants.....	20
9.1.	Première étape : insertion d'une cassette <i>galk</i>	21
9.2.	Deuxième étape : remplacement de la cassette <i>galk</i> par la cassette contenant le gène d'intérêt.....	22
V.	RESULTATS	24
1	<i>Design</i> d'un plasmide lentiviral encodant la forme soluble de TRAIL.....	24
2	Expression de sTRAIL dans des cellules eucaryotes.....	25
3	Production de particules lentivirales de seconde génération	26
4	Analyse de la transduction du virus LV_pNES_sTRAIL sur des cellules U87 CXCR4 ⁺ nih2.....	27
5	Analyse de la spécificité du promoteur nestine.....	29
6	Génération d'un herpès virus oncolytique encodant la cassette pNES_sTRAIL.....	30
VI.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	32

VII REFERENCES.....	VIII
Annexes.....	XIII

Liste des figures et tables

		Page
Figure 1	Invasion de la zone sous-ventriculaire des CSCs de GBM au départ d'une masse tumorale	1
Figure 2	La chimiokine CXCL12	2
Figure 3	Représentation schématique du récepteur CXCR4	2
Figure 4	Interaction CXCR4-CXCL12	3
Figure 5	Migration des GSC vers la SZV via la voie CXCR4/CXCL12	3
Figure 6	Structure du gène nestine chez l'Homme	4
Figure 7	Schéma de la structure de HSV-1	6
Figure 8	Organisation du génome de HSV-1	6
Figure 9	Cycle lytique de HSV-1	7
Figure 10	La protéine TRAIL	9
Figure 11	TRAIL et ses récepteurs	10
Figure 12	Voie extrinsèque de l'apoptose induite par TRAIL	11
Figure 13	Vecteur modèle développé par Shah <i>et al.</i>	24
Figure 14	Liste des plasmides lentiviraux générés	24
Figure 15	Les cellules HEK 293T Lx1B4 expriment le promoteur nestine	24
Figure 16	Le plasmide pLV_pNES_sTRAIL induit la production de la forme modifiée de TRAIL	25
Figure 17	La protéine TRAIL et sTRAIL est exprimée dans le cytoplasme	25
Figure 18	Les cellules transduites acquièrent une résistance à la blasticidine	26
Figure 19	La protéine sTRAIL est exprimée par les cellules transduites	27
Figure 20	Le virus LV_pNES_sTRAIL a un effet sur les cellules U87CXCR4 ⁺ nih2	28
Figure 21	Le virus LV_pNES_sTRAIL induit la mort cellulaire	29
Figure 22	La production de la protéine sTRAIL induit le clivage de PARP	29
Figure 23	Le promoteur nestine est actif dans les cellules gliales	30
Figure 24	L'expression de la protéine sTRAIL induite par le virus LV_pNES_sTRAIL cause la mort des cellules neuronales	31
Figure 25	La cassette <i>galk</i> est correctement intégrée dans le BAC fHSV-Quik-1 en lieu et place de la cassette pNES_sTRAIL	31
Table 1	Liste des lentivirus utilisés et leurs caractéristiques	14
Table 2	Composition d'un gel de polyacrylamide	16
Table 3	Liste des anticorps utilisés	16
Table 4	Liste des oligonucléotides utilisés	17
Table 5	Titration des particules virales	26

Liste des abréviations

CSC	Cellule souche cancéreuse
CXCL12	<i>CXC chemokine ligand 12</i>
CXCR4	<i>CXC chemokine Receptor 4</i>
DD	<i>Death Domain</i>
DISC	<i>Death-Inducing Signaling Complex</i>
DR	<i>Death Receptor</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GBM	Glioblastome multiforme
GSC	<i>Glioblastoma Stem Cell</i>
HSV-1	Herpès Virus Simplex de type 1
HVEM	<i>Herpes Virus Entry Mediator</i>
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
oHSV	Herpès Virus Simplex oncolytique
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
OV	Virus Oncolytique
SDF-1	<i>Stroma cell Derived Factor 1</i>
SNC	Système Nerveux Central
TIF	<i>Trans-Induction Factor</i>
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
VHS	<i>Virion Host Shut-off</i>
ZSV	Zone Sous-Ventriculaire

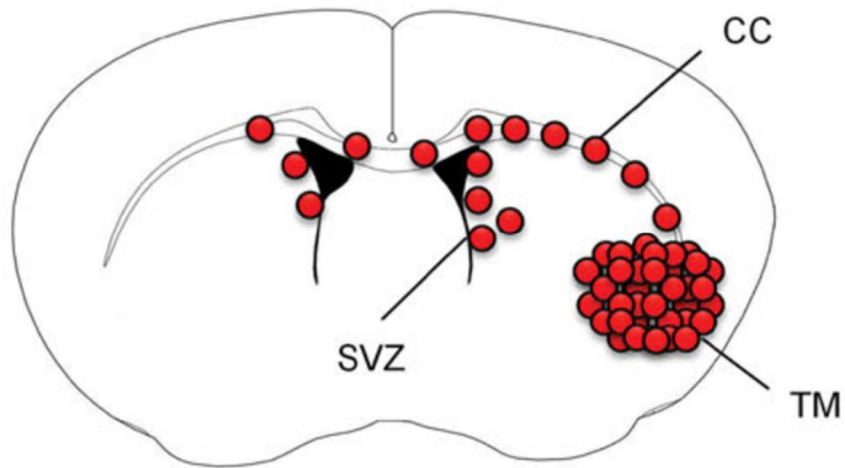


Figure 1 : Invasion de la zone sous-ventriculaire des CSCs de GBM au départ d'une masse tumorale. Les cellules de la masse tumorale (TM) vont spécifiquement coloniser la zone sous-ventriculaire (SVZ) après migration via le corps calleux (CC) Goffart *et al.*⁵

I. INTRODUCTION

1 Le glioblastome multiforme

Les tumeurs gliales malignes sont les tumeurs cérébrales primaires les plus répandues chez les personnes adultes. La forme la plus agressive d'entre-elles mais aussi la plus fréquemment rencontrée est le glioblastome multiforme (GBM)¹. Cette tumeur est classifiée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme astrocytome de grade IV selon des caractéristiques biologiques bien précises: une prolifération incontrôlée des cellules gliales du système nerveux central, une infiltration diffuse et non délimitée de la tumeur, une tendance à la nécrose, une forte angiogenèse ainsi qu'une résistance à l'apoptose². De plus, la gravité de ce cancer est définie par sa propagation très rapide, son haut taux de récurrence, sa capacité de migration vers la zone sous-ventriculaire et le très mauvais pronostic associé³.

Malgré les traitements actuels (radiothérapie, chimiothérapie et résection chirurgicale), les patients atteints de GBM présentent un taux de survie en général de 12 à 15 mois en raison des récurrences particulièrement fréquentes^{1,4}. Il est donc primordial de développer de nouvelles méthodes thérapeutiques qui permettront non seulement de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses mais également d'empêcher toute rechute due aux cellules souches tumorales qui peuvent échapper à la résection^{3,5}.

2 Des cellules souches cancéreuses

En 2003, la découverte d'une sous-population cellulaire, appelée cellules souches cancéreuses (CSCs), a permis d'expliquer la récurrence des GBMs⁶. Ces cellules sont capables de quitter la masse tumorale et de coloniser préférentiellement la zone sous-ventriculaire (ZSV) du cortex (figure 1). Elles présentent à leur surface des marqueurs membranaires de prolifération, d'auto-renouvellement et de différenciation, leur permettant d'échapper aux thérapies visant les cellules différenciées. De plus, à distance du site initial de la tumeur, ces CSCs sont capables de générer de nouvelles masses cancéreuses post-résection. Elles s'auto-régulent en détournant le microenvironnement de cytokines initialement sécrétées pour maintenir les jeunes cellules neuronales en quiescence dans la zone sous ventriculaire^{1,6,7}.

2.1 Les marqueurs des CSCs

Le rôle des cellules souches cancéreuses dans les cancers malins fut très étudié ces dernières années. Il est désormais bien établi que ces cellules participent activement au processus d'initiation de la tumeur, de sa progression, de la formation des métastases et de la rechute⁸. Elles sont caractérisées par la présence ou l'absence de marqueurs spécifiques.

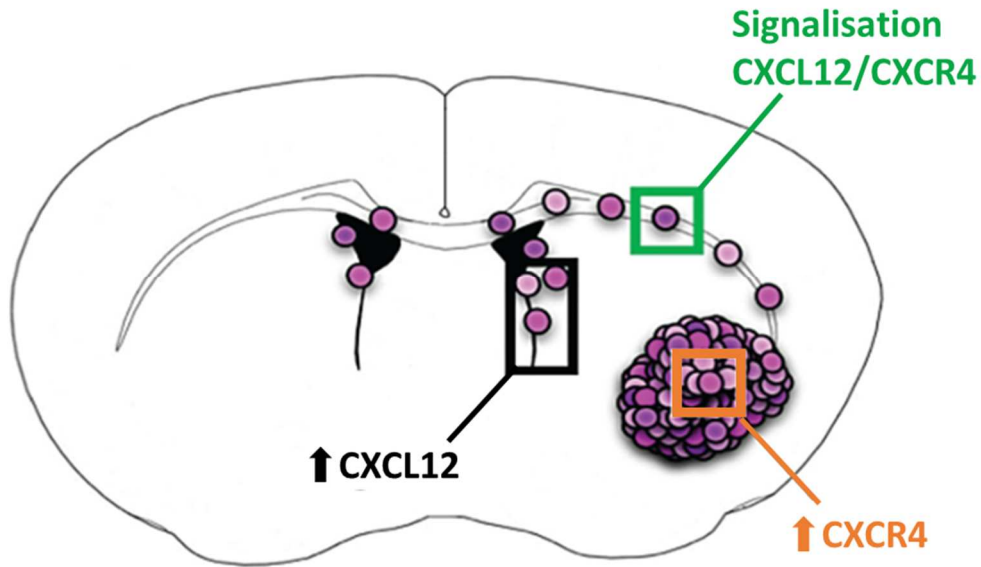


Figure 2 : Migration des GSC vers la SVZ via la voie CXCR4/CXCL12. L'augmentation de la concentration en CXCL12 dans la SVZ maintient un microenvironnement. Les cellules venant de la masse tumorale surexpriment CXCR4 et migrent vers la SVZ. Adapté de Goffart *et al.*⁷

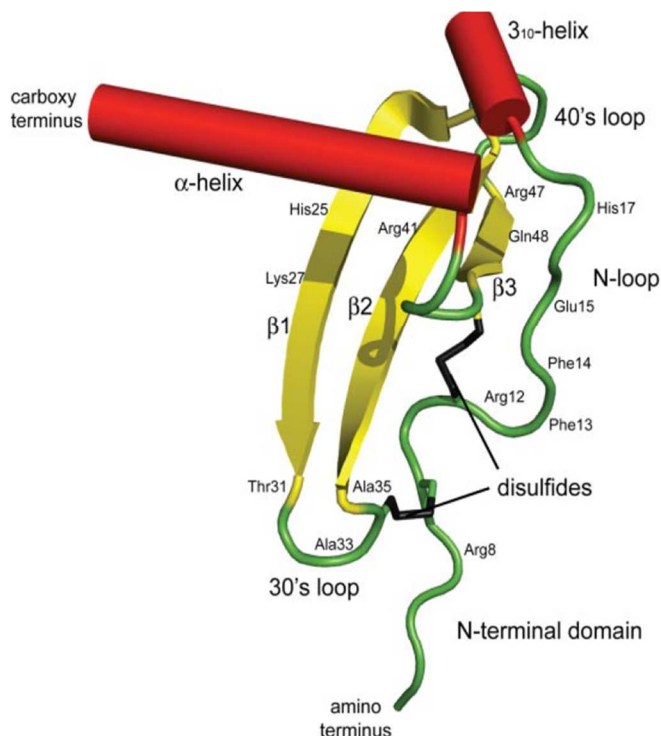


Figure 3 : La chimiokine CXCL12. Ce monomère est composé d'une région N-term et d'une longue boucle N (*N-loop*) en vert, de trois brins β anti parallèles jaunes reliés entre eux par les boucles *40's loop* et *30's loop*, et d'un domaine C-terminal organisé en hélice α en rouge. En noir sont représentés les deux ponts disulfures formés entre les résidus cystéines. Murphy *et al.*¹⁹

Parmi ces marqueurs, on retrouve ceux des protéines membranaires telles que CD15, CD24, CD44, CD133, CXCR4, NCAM et les transporteurs ABC, mais aussi des protéines cytoplasmiques comme la nestine, l'aldéhyde déshydrogénase et la RNA-binding protéine Musashi 1 ou nucléaires comme Sox-2, Oct3 et Nanog^{8,9}. CD133 et la nestine sont les marqueurs les plus couramment utilisés pour l'identification de cellules souches neuronales et sont devenus nécessaires à la caractérisation du glioblastome et donc des CSCs¹⁰.

2.2 L'importance de la zone sous-ventriculaire

Les cellules souches du glioblastome (GSC), sont notamment impliquées dans la tumorigenèse, dans le maintien des tumeurs et dans leur résistance thérapeutique. Plusieurs études démontrent que ces cellules du GBM présentent une affinité pour la zone sous-ventriculaire (ZSV) du cerveau^{1,5,7}. En effet, cette région conserve la capacité de produire des neurones et des cellules gliales tout au long de la vie, fonctionnant comme une source de cellules souches et de progéniteurs chez les adultes⁵. Les GSC ont tendance à quitter la masse tumorale initiale pour aboutir dans la ZSV via la signalisation CXCL12/CXCR4 (figure 2)⁴. Plus récemment, il a été montré que la sécrétion de la cytokine CXCL12 par les cellules endothéliales, tumorales et les cellules souches cancéreuses maintient un microenvironnement qui contribue au renouvellement, à la survie et à la migration des GSC, les protégeant dès lors des agents thérapeutiques^{11,12,13}.

2.3 Les chimiokines

Les cytokines chimiostatiques (appelées chimiokines) représentent une famille de protéines basiques de faible poids moléculaire (8 à 17 kDa) sécrétées par différents types cellulaires. Elles sont principalement impliquées dans la migration des globules blancs, leur activation, le contrôle de leur recrutement, leur fonction effectrice, mais aussi dans la modulation de l'hématopoïèse, de l'angiogenèse et de l'immunité adaptative^{14,15,16}. En plus de leur rôle de chémo-attracteur envers les leucocytes, les chimiokines sont impliquées dans l'initiation, le développement, la progression tumorale et également dans le développement des métastases^{17,18}.

2.4 La chimiokine CXCL12

CXCL12 (*CXC chemokine ligand 12*, figure 3) est exprimée constitutivement par une large variété de tissus à la différence des autres chimiokines dont l'expression est induite par des signaux plus spécifiques¹⁹. Cette chimiokine, initialement nommée SDF-1 (*Stromal cell Derived Factor-1*), est l'unique ligand endogène de CXCR4 et CXCR7 (avec CXCL11), récepteurs surexprimés dans des GSCs (*Glioblastoma Stem Cells*)²⁰. Elle possède deux

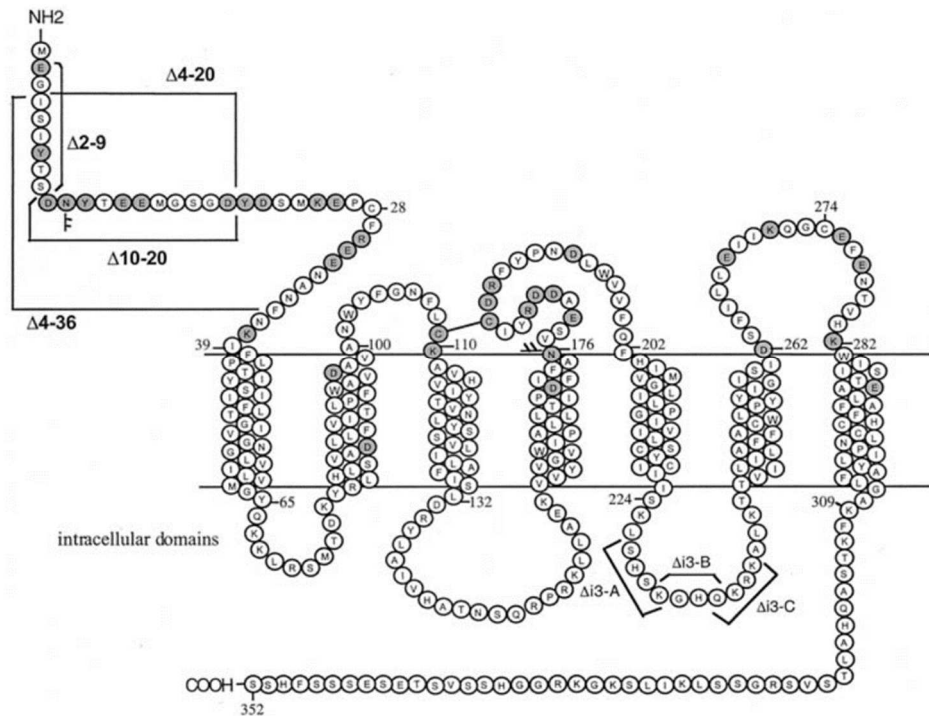


Figure 4 : Représentation schématique du récepteur CXCR4. Ce récepteur possède une extrémité N-terminale, trois boucles extracellulaires, sept hélices transmembranaires, trois boucles intracellulaires et une extrémité C-terminale cytoplasmique. Le pont disulfure entre les boucles extracellulaires est également représenté. Brelot et *al*²²

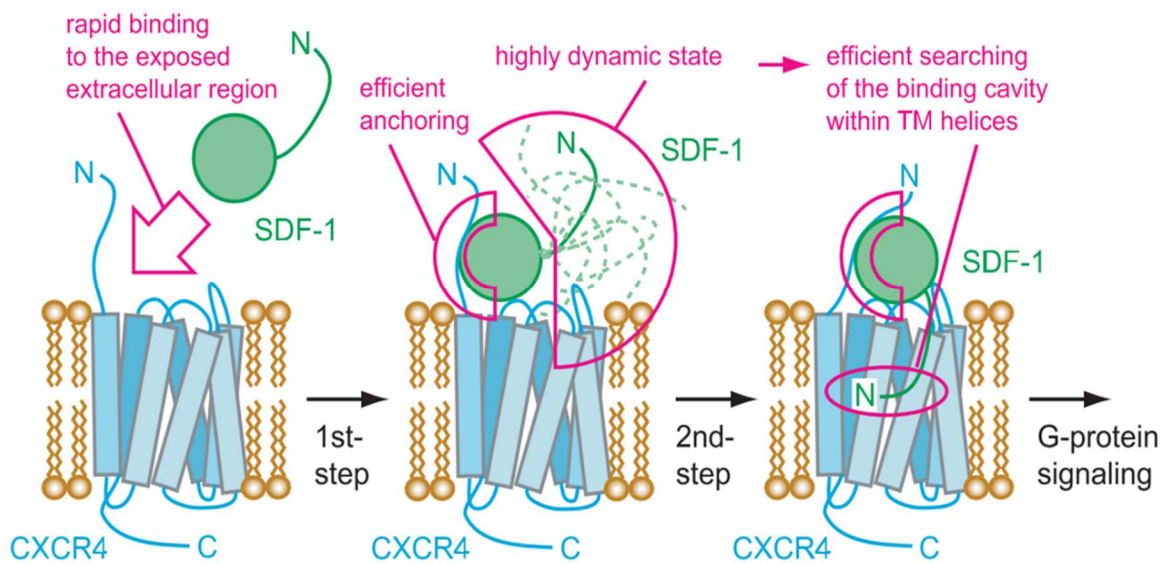


Figure 5 : Interaction CXCR4-CXCL12. Représentation schématique du mécanisme en deux étapes. Kofuku, Y. *et al*²⁴

isoformes majeures (CXCL12 α de 68 acides aminés, et CXCL12 β de 72 acides aminés) chacune issue d'un même gène, mais qui diffèrent par la présence de 5 acides aminés en position C-terminale dans la forme β suite à un épissage alternatif²¹. Etant une molécule pro-inflammatoire, elle agit sur le chimiotactisme des cellules hématopoïétiques et est impliquée dans la lymphopoïèse, la myélopoïèse, la migration des progéniteurs hématopoïétiques ainsi que dans le développement embryonnaire d'organes cruciaux tels que le cœur, le cerveau et les vaisseaux sanguins. CXCL12 joue donc un rôle dans la migration cellulaire dans le système nerveux central (SNC) en cours de développement^{18,19,21}.

2.5 Le récepteur CXCR4

Le récepteur CXCR4 (CXC chemokine Receptor type 4, figure 4) fait partie des 18 récepteurs de chimiokines connus pour leur implication dans la migration cellulaire selon un gradient de cytokines. Ces récepteurs sont des protéines membranaires couplées à des protéines G et composées de 7 domaines transmembranaires. Ils sont subdivisés en 4 groupes selon la position de leurs deux premières cystéines (CXC, CC, C et CX₃C) et leur expression varie selon le type cellulaire²².

CXCR4 est retrouvé dans une grande variété de tissus (dont la moelle osseuse, la rate et le thymus), il est également impliqué dans la prolifération tumorale, surexprimé dans certains cancers dont le GBM et est associé au faible pronostic de survie des patients^{4,22}. La signalisation médiée par CXCR4/CXCL12 favorise la genèse de la tumeur et augmente la prolifération cellulaire tout en augmentant l'angiogenèse via le facteur de croissance VEGF²³. Cet axe CXCR4/CXCL12 est crucial dans l'échappement des CSCs aux radiations et agents chimiothérapeutiques, il est donc une cible de choix dans l'étude du GBM.

L'interaction entre CXCL12 et le récepteur CXCR4 est un mécanisme en deux étapes (figure 5). Dans un premier temps, la région N-term de la chimiokine reconnaît rapidement la région exposée du récepteur (N-term également). Cela va permettre à CXCL12 de s'ancrer à cette partie extracellulaire de CXCR4. Cette étape préliminaire est importante pour la spécificité et l'affinité du ligand envers le récepteur. La seconde étape de la liaison consiste à un changement de conformation des feuillets transmembranaires de CXCR4 permettant l'activation de la protéine G et donc la transmission du signal à l'intérieur de la cellule²⁴.

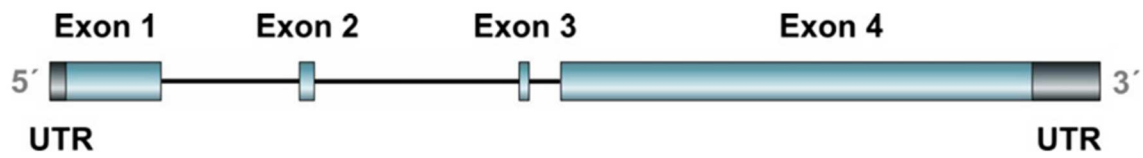


Figure 6 : Structure du gène nestine chez l'Homme. Les exons sont représentés en bleu, la région 5'UTR se situe en amont du premier exon, la région 3'UTR se situe en aval du 4^e exon. Neradil et Veselska ³¹

3 La nestine

Comme cité plus haut, la nestine est un marqueur couramment utilisé pour l'identification de cellules souches neuronales, notamment les cellules souches cancéreuses¹¹. Cette protéine fait partie de la superfamille des filaments intermédiaires de type IV. Les filaments intermédiaires représentent un des trois composants principaux du cytosquelette des cellules animales (avec les filaments d'actine et les microtubules). Les filaments intermédiaires ont un diamètre de 8 à 12 nm et sont composés de protéines fibrillaires assemblées de façon hélicoïdale. Sur base de la nature des polymères constituant les protéines fibrillaires, 5 sous-types ont été identifiés. On y trouve les kératines (acides et basiques), la vimentine, les neurofilaments, les lamines ainsi que des protéines fibrillaires en rapport avec les cellules gliales. La nature protéique des filaments intermédiaires est variable d'un type cellulaire à l'autre : vimentine dans les fibroblastes, neurofilaments dans les neurones, cytokératine dans les cellules épithéliales, lamine dans les noyaux, mais leur structure de base reste identique²⁵. Les filaments intermédiaires sont nécessaires au maintien de la forme cellulaire et à l'ancrage des différents organites. Ils interviennent donc dans la solidité de la cellule, mais aussi dans l'adhérence et la cohésion cellulaire car ils sont en relation avec les desmosomes et les hémidesmosomes^{26,27}.

Par conséquent, l'étude des filaments intermédiaires est un excellent moyen d'analyser les mécanismes impliqués dans les transitions cellulaires. Il est établi que les cellules souches du système nerveux central en développement expriment fortement la nestine⁹. En effet, l'expression du gène codant pour cette protéine semble être fortement associée à l'état des cellules progénitrices du SNC. Par ailleurs, on retrouve également la nestine dans les cellules qui s'auto-renouvèlent au niveau de la zone ventriculaire chez l'adulte et dans le muscle squelettique en développement^{28,29}. Dans le *striatum* embryonnaire (et surtout dans la zone ventriculaire), on retrouve jusqu'à 95% de cellules nestine-positives avant leur différenciation. *In vitro*, ces cellules expriment de moins en moins la protéine lors de leur différenciation^{28,30}. En comparaison avec des cancers du cerveau de moindre malignité, les glioblastomes expriment très fortement la nestine. Cela indique une corrélation entre l'expression de la nestine et le caractère malin des groupes de tumeurs du SNC.

3.1 Un promoteur nestin

L'équipe de C. Lothian et U. Lendahl a démontré en 1997 que le second intron du gène codant pour la nestine est très conservé chez le rat et l'homme (figure 6)³¹. De plus, une étude de la régulation du gène codant pour la nestine chez le rat et l'Homme a établi

que ce second intron agit comme un *enhancer* dans le cerveau en développement, dirigeant l'expression dans les cellules neuroépithéliales. Les éléments présents dans le second intron sont donc capables de diriger fortement et spécifiquement l'expression d'un gène rapporteur lors du développement neuroépithélial^{28,31,32}. L'étude de l'expression du gène rapporteur *lacZ* sur des embryons de souris transgéniques a permis d'établir la présence d'éléments dirigeant l'expression de la nestine au niveau du second intron à différentes étapes du développement du SNC, en particulier les deux domaines fortement conservés chez le rat et l'Homme faisant 57 et 38 pb de long (> 90% d'identité)^{31,33}. L'utilisation d'un tel promoteur a déjà démontré qu'il est possible de diriger l'expression d'une protéine dans les cellules de glioblastome^{34,35}.

4 Les nouvelles thérapies

La complexité du GBM rend difficile le traitement des patients par les approches classiques. Parmi les nouvelles stratégies thérapeutiques, on retrouve la thérapie génique, l'immunothérapie, la thérapie par cellules souches et l'édition de génome par le système CRISPR/Cas9³. Une des dernières armes établies contre le cancer est l'utilisation des virus oncolytiques.

4.1 Une nouvelle arme contre le cancer : les virus oncolytiques

Un virus oncolytique (OV) est un virus atténué qui n'infecte ou ne se réplique que dans des cellules en forte division (cancéreuses), conduisant à leur lyse et épargnant les cellules non infectées. Plusieurs virus ayant ces propriétés ont été répertoriés et sont d'importants agents thérapeutiques dans la recherche contre le cancer. Certains d'entre eux ont naturellement un tropisme préférentiel pour les cellules tumorales, d'autres ont été sélectionnés et/ou génétiquement modifiés à cette fin. C'est le cas de l'Herpès Simplex Virus (HSV)^{36,37}.

4.2 Un herpès virus oncolytique

L'herpès virus oncolytique (oHSV) fut un des premiers virus oncolytique génétiquement créés et reconnu par la FDA (*Food and Drug Administration*) pour son utilisation dans le traitement de mélanomes. Les avantages de son utilisation sont nombreux : son génome est connu, il présente de nombreux gènes non essentiels et nous disposons de plusieurs antiviraux permettant de contrôler le virus en cas de problème d'infection. Il fait donc l'objet d'une attention toute particulière et a déjà démontré ses effets prometteurs dans le contexte du GBM³⁸. Il est dérivé d'un herpès simplex virus de type 1 qui a été atténué en réalisant des mutations (délétions entre autres) dans son génome. Parmi

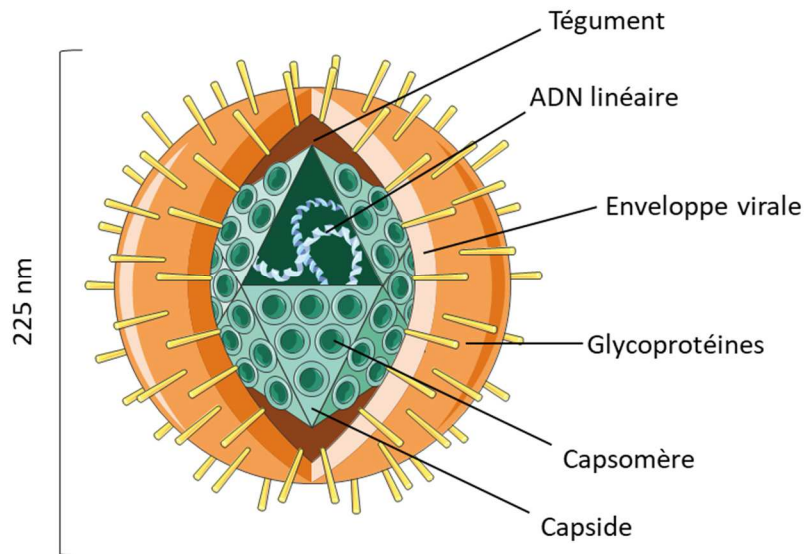


Figure 7 : Schéma de la structure de HSV-1. Le génome viral (ADN double brin) est protégé par une capsid icosaédrique (100-110 nm). Le tégument composé de 26 protéines sépare la capsid de l'enveloppe virale. Cette enveloppe est recouverte de glycoprotéines virales .



Figure 8 : Organisation du génome de HSV-1. Les unités longues, U_L et courtes U_S sont séparées par des régions répétées et inversées TR_L et IR_L encadrant U_L et IR_S et TR_S encadrant U_S

elles, on retrouve la délétion du gène ICP34.5 (encodant une protéine neurovirulente) qui rend la réplication dépendante de la voie MEK³⁹. MEK est une kinase régulatrice activée par les MAPKkinases dont la fonction principale est d'assurer la survie cellulaire et la prolifération. Elle est d'autant plus activée dans les cellules tumorales qui présentent une dérégulation dans l'expression de facteurs de croissance⁴⁰. La délétion du gène viral ICP6 (encodant une ribonucléotide réductase), empêche quant à elle la réplication du virus dans les cellules quiescentes. Sa fonction est complétée par l'expression de gènes spécifiques du métabolisme des acides nucléiques qui est accrue dans les cellules en division⁴¹. Ainsi, la délétion de ces gènes de réplication virale est complétée par le métabolisme des cellules tumorales.

Cet herpès virus oncolytique atténué peut par ailleurs être modifié pour cibler spécifiquement une sous-population cellulaire bien précise, comme par exemple les GSC, et être armé avec des gènes codant pour des protéines induisant la mort des cellules ainsi ciblées. Plusieurs équipes de chercheurs ont récemment démontré l'utilisation de tels virus armés contre le glioblastome multiforme pour induire l'apoptose cellulaire^{42,43,44}.

4.3 HSV-1

L'herpès virus de type 1 (HSV-1) appartient à la famille des *Alphaherpesviridae* comprenant plus de 200 membres. Les virus appartenant à cette famille sont caractérisés par un cycle répliatif rapide et très lytique, une gamme d'hôtes restreinte, un fort neurotropisme ainsi qu'une capacité à entrer en latence au niveau du système nerveux périphérique. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 90% de la population mondiale est infectée par un virus faisant partie de cette famille⁴⁵. Le virus HSV-1 est celui que l'on rencontre le plus fréquemment chez l'homme et est à l'origine d'une maladie très contagieuse. La primo-infection à HSV-1 survient généralement dans l'enfance et, le plus souvent, est asymptomatique. Après cette infection initiale, l'HSV-1 reste latent dans les ganglions nerveux sensitifs à partir desquels il peut périodiquement se réactiver pour déclencher différents symptômes. Dans l'immense majorité des cas, il s'agit d'herpès orofacial/labial, mais il existe une certaine proportion d'infections génitales à HSV-1^{45,46}.

Structurellement, le virion présente une forme sphérique de 225 nm et est composé de trois éléments principaux, une nucléocapside protégeant le génome, une bicouche lipidique formant une enveloppe, et entre les deux, une région protéique nommée le tégment⁴⁷. La capsid protectrice présente une symétrie icosaédrique, contient l'ADN double brin empaqueté et est composée de 162 capsomères^{45,48} (figure 7).

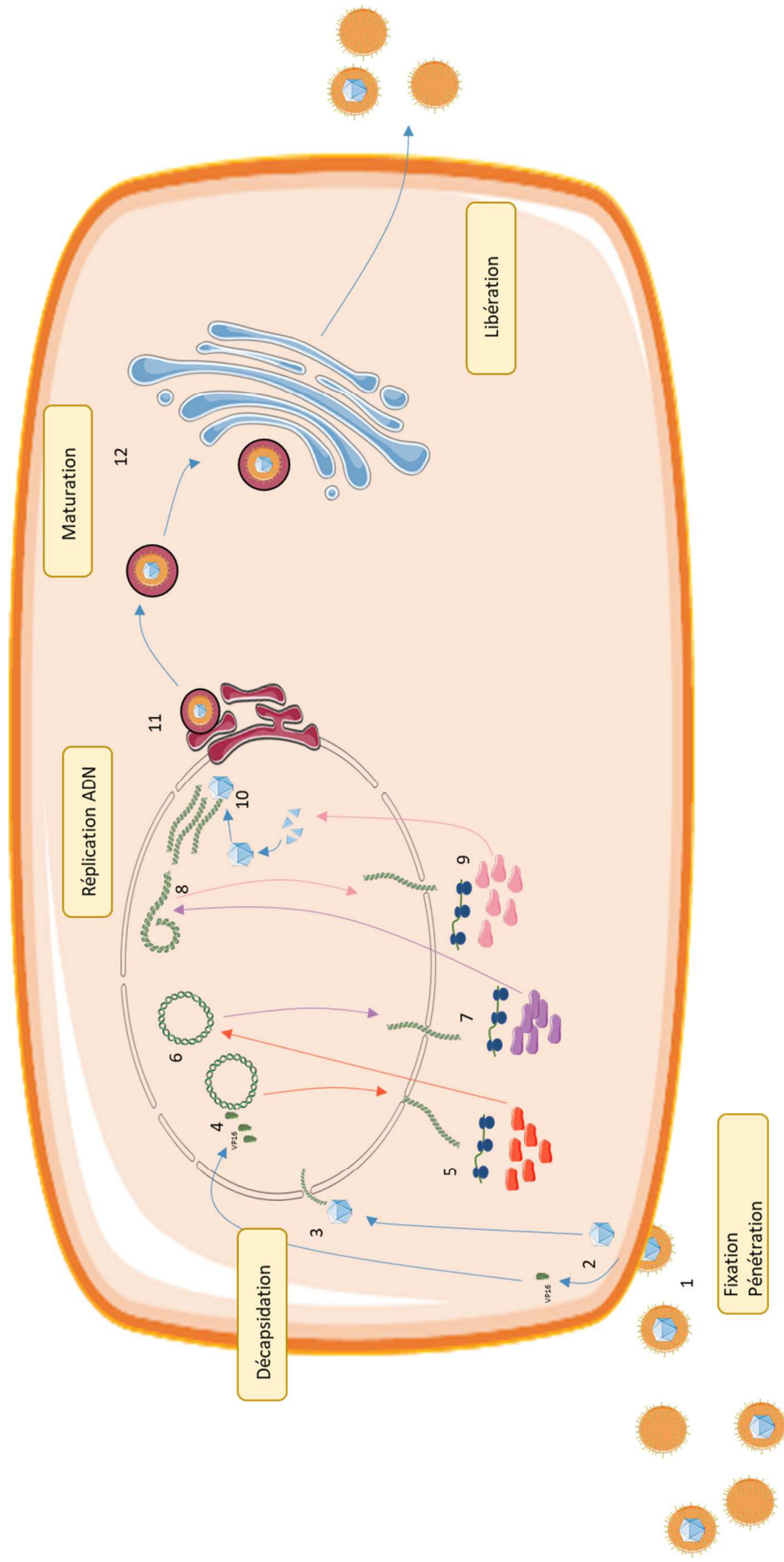


Figure 9 : Cycle lytique de HSV-1. 1: Fusion de l'enveloppe virale à la membrane cellulaire. 2: Pénétration de la nucléocapside et libération des protéines du tégment (en vert) dans le cytoplasme, dont la protéine VP16. 3: Migration de la nucléocapside vers le noyau et libération de l'ADN viral. 4: Circularisation de l'ADN viral et activation de la transcription des gènes α par VP16. 5: Traduction des messages β en protéines β , dont la thymidine kinase et l'ADN polymérase virales. 8: Réplication de l'ADN viral par l'ADN polymérase selon le mécanisme de cercle roulant et activation de la transcription des gènes γ . 9: Traduction des messages γ en protéines γ , principalement structurales. 10: Assemblage des protéines structurales, avec encapsidation des ADN viraux néosynthétisés. 11: Les capsides virales s'enveloppent par bourgeonnement de la lamelle interne de la membrane nucléaire. 12: Les particules virales continuent leur maturation au travers du Golgi et sortent de la cellule par exocytose. (Adapté de Traité de virologie médicale, J-M Hureau, J-C Nicolas, H Agut, H Peigue-Lafeuille 2003 Ed ESTEM, p163).

Le génome de l'alpha herpès virus encode plus de 80 gènes codant pour les protéines structurales et pour tous les facteurs nécessaires à sa réplication dans la cellule hôte ^{45,49}. Il se présente sous forme d'ADN double brin (152 kpb) et est constitué de deux unités uniques (longues, U_L et courtes, U_S) séparées par une région comprenant des séquences répétées et inversées. Les séquences encadrant la partie U_L sont désignées TR_L et IR_L, tandis que celles encadrant la composante U_S sont IR_S et TR_S (figure 8).

4.3.1 Cycle lytique HSV-1

L'infection par HSV-1 se fait en plusieurs phases et débute par l'attachement et la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique de la cellule. La première étape est l'interaction des glycoprotéines de surface du virus avec les récepteurs cellulaires. Les glycoprotéines virales impliquées dans cette fusion sont les glycoprotéines C et B (gC et gB) qui interagissent avec les glycosaminoglycanes de la surface cellulaire (comme l'héparane sulfate) ⁴⁵.

Ensuite, la gD se lie à des récepteurs cellulaires identifiés comme étant des molécules appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF- α (*Tumor Necrosis Factor*) telle que HVEM (*Herpes Virus Entry Mediator*) et des molécules apparentées au récepteur des poliovirus, appartenant à la superfamille des immunoglobulines telle que la nectine ⁵⁰. La fusion de l'enveloppe externe virale avec la membrane plasmique nécessite également la présence de gB et d'un hétérodimère formé de gH et de gL ⁵¹. Elle libère dans le cytoplasme la nucléocapside et les protéines tégumentaires du virus. Parmi celles-ci, la protéine VHS (*Virion Host Shut-off*, U_L41) dégrade les ARN messagers cellulaires, et donc interrompt les synthèses protéiques de la cellule, tandis que la VP16 ou α -TIF (*Trans-Induction Factor*, U_L48) migre vers le noyau et servira d'activateur transcriptionnel des gènes IE. La nucléocapside, transportée par le cytosquelette via les microtubules, parvient à un pore de la membrane nucléaire où elle livre l'ADN au noyau ^{52,53,54}.

Une fois libéré dans le noyau de la cellule hôte, l'ADN viral se circularise via les séquences répétitives inversées terminales, et il est transcrit par l'ARN polymérase II cellulaire. Transcription et traduction se font en trois phases successives : α (*Immediate-Early* IE), β (*Early* E) et γ (*Late* L), régulées en cascade. Les gènes α /IE sont les premiers à être transcrits en utilisant l'appareil transcriptionnel de l'hôte. Font partie de ces gènes : ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47, et US1.5. Ils servent principalement à activer l'expression des gènes β ^{45,55} (figure 9).

Les protéines encodées par les gènes β sont essentiellement des enzymes virales impliquées dans le métabolisme des acides nucléiques et la synthèse de l'ADN viral (comme la ribonucléotide réductase U_L39-U_L40, la thymidine kinase U_L23, la DNase alcaline, la dUTPase U_L50, l'ADN polymérase U_L30, l'hélicase, la primase,...). Ces gènes suppriment l'expression d'enzymes cellulaires mais aussi des gènes α et vont également permettre l'activation des gènes tardifs. Le niveau d'expression de l'ADN polymérase atteint son maximum 4 heures post-infection et la réplication de l'ADN viral qui s'en suit dans le noyau se fait par un mécanisme de cercle roulant^{45,56}.

Enfin, l'expression des gènes γ tardifs est induite par les protéines α ou β et ils ne sont transcrits qu'une fois la réplication de l'ADN viral entamée. Cela aboutit principalement à la production des protéines structurales, protéines de la nucléocapside et glycoprotéines d'enveloppe. La morphogenèse de la capsid, dont VP5 est la protéine principale (*major capsid protein*), met en jeu des protéines d'échafaudage et une protéase virale. Les capsides s'auto-assemblent dans le noyau et s'y accumulent, emprisonnant l'ADN viral néosynthétisé. Grâce aux protéines codées par UL36 et UL37, les capsides sont ensuite transportées du noyau vers le cytoplasme et la formation de l'enveloppe virale se fait à partir de la membrane du Golgi⁵⁷. Enfin, la sortie des virions hors de la cellule se fait par exocytose⁵².

5 Induire la mort cellulaire

L'apoptose (ou la mort cellulaire programmée) est le processus par lequel les cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal intrinsèque ou extrinsèque. C'est l'une des voies possibles de la mort cellulaire qui est physiologique, programmée génétiquement et indispensable à la survie des organismes multicellulaires. Il y a un équilibre constant entre la prolifération cellulaire et l'apoptose. Contrairement à la nécrose, l'apoptose ne provoque pas d'inflammation : les membranes plasmiques ne sont pas détruites directement, et la cellule émet des signaux de mort qui permettront sa phagocytose par les cellules de l'immunité, notamment des macrophages. Dans les cellules cancéreuses, l'équilibre entre l'apoptose et la prolifération cellulaire est rompu. Les cellules deviennent résistantes à l'apoptose et se multiplient de façon anarchique. Une piste dans le traitement du cancer serait d'induire, voire de forcer l'apoptose de ces cellules tout en épargnant les cellules saines environnantes.

5.1 TRAIL pour induire l'apoptose

La protéine TRAIL (*Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) fait partie de la famille des TNF et est capable d'induire l'apoptose par la voie extrinsèque (ligand-

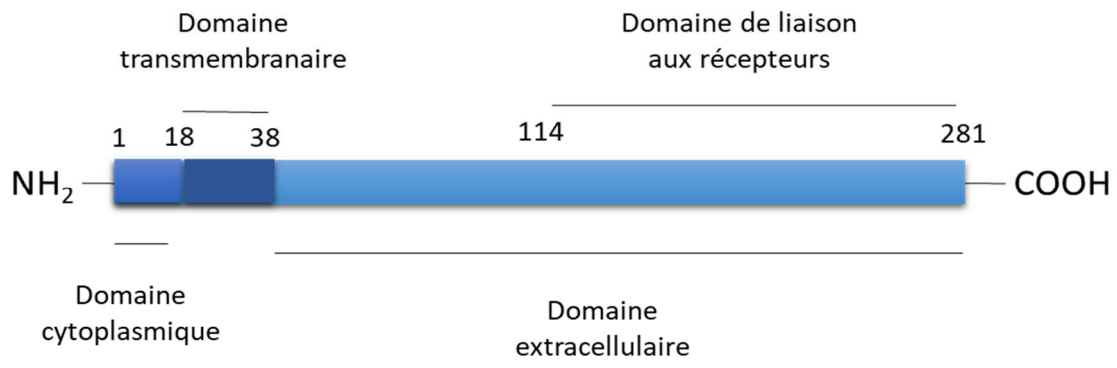


Figure 10 : TRAIL. Adapté depuis Uniprot P50591

dépendante) activant la voie des caspases. Cette protéine, connue également sous le nom de TNFSF10, ou Apo2L est exprimée constitutivement dans toutes les cellules. On la retrouve particulièrement au niveau des poumons, de la rate et de la prostate, elle y est exprimée à la surface des NK (*Natural Killer*), des cellules T, des macrophages et des cellules dendritiques⁵⁸.

TRAIL est composée de 281 acides aminés et présente une masse moléculaire de 32.52 kDa avec un point isoélectrique de 7,63⁵⁹. Chez l'Homme, le gène encodant TRAIL se situe sur le chromosome 3 à la position 3q26. TRAIL est une protéine transmembranaire de type II ancrée dans la membrane du réticulum endoplasmique via des résidus hydrophobes, avec la partie C-term tournée vers la lumière du réticulum et la partie N-term tournée vers le cytosol. Sa partie C-term extracellulaire (acides aminés de 114 à 281 comprenant la séquence signal) peut être clivée lors de son expression à la membrane plasmique pour donner une forme soluble sécrétée mature de la protéine⁵⁸. La forme clivée soluble est biologiquement active et présente une masse moléculaire de 19-20 kDa pouvant former des homotrimères^{42,60} (Figure 10).

Comme pour la plupart des membres de la famille TNF, TRAIL forme des homotrimères pouvant se lier à 3 molécules réceptrices. Le domaine carboxy-terminal extracellulaire de TRAIL présente une homologie avec FasL (23,2%) et TNF (19,0%), mais contrairement à FasL et TNF, TRAIL porte un ion zinc à l'interface du trimère, qui est coordonné via un résidu de cystéine libre (Cys230) de chaque monomère. Cela est un point essentiel de l'intégrité structurelle de TRAIL, de sa stabilité et de sa capacité à induire l'apoptose^{60,61,62}.

5.2 Les récepteurs de TRAIL

TRAIL induit l'apoptose en interagissant avec ses récepteurs. Cinq récepteurs sont connus à l'heure actuelle et appartiennent tous à la superfamille des récepteurs TNF : deux sont des récepteurs de mort (*death receptor*, DR4 et DR5), deux autres agissent plutôt en tant que leurre (*decoy receptor*, DcR1 et DcR2) et le dernier récemment découvert est l'ostéoprotégérine (OPG). Cette dernière fut initialement identifiée comme un récepteur soluble de RANK/OPGL mais elle est capable de lier TRAIL^{63,64}.

DR4/TRAIL-R1 et DR5/TRAIL-R2/KILLER sont des protéines transmembranaires de type I de 468 (DR4) et 411 (DR5) acides aminés et sont surexprimées dans certains cancers dont le GBM⁶⁵. Ces deux récepteurs contiennent un peptide signal amino-terminal extracellulaire, deux domaines extracellulaires riches en cystéines, un domaine

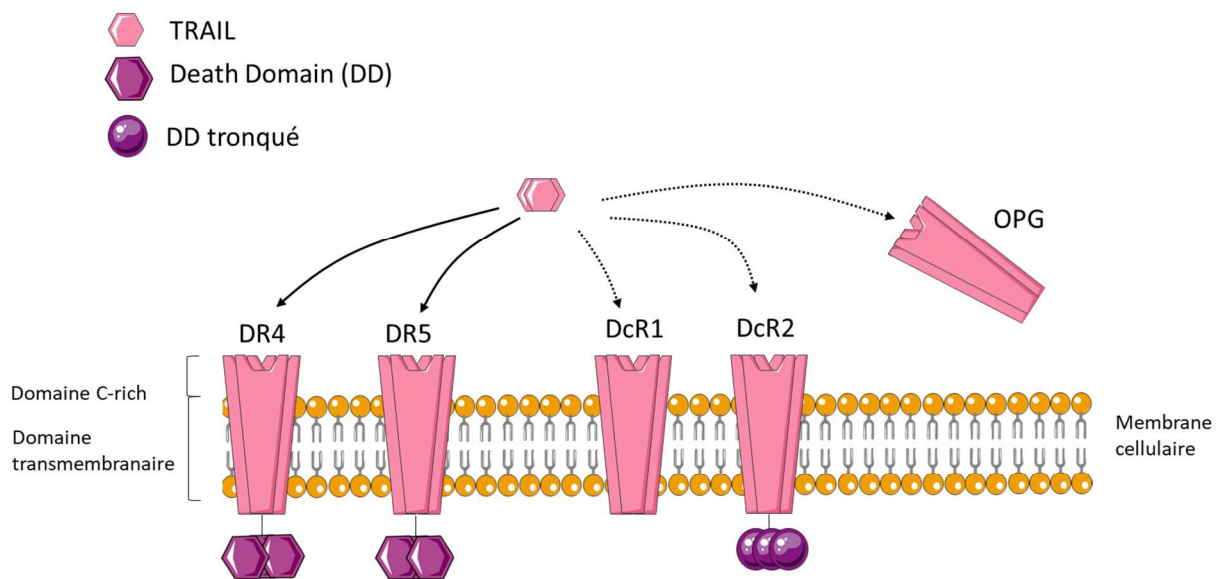


Figure 11 : TRAIL et ses récepteurs

transmembranaire et une région carboxy-terminale cytoplasmique. De plus, DR4 et DR5 présentent une homologie dans leurs deux domaines extracellulaires riches en cystéine qui sont des sites de liaison du ligand TRAIL. Les régions carboxy-terminales intracellulaires de DR4 et DR5 contiennent un domaine de 70 acides aminés présentant une forte similarité avec les domaines de mort (DD, *Death Domain*) de TNFR1 et Fas qui, lors de la liaison au ligand, initient une cascade de signalisation d'apoptose^{66,67}. En outre, il a été démontré que le récepteur DR5 est surexprimé dans les tissus issus de glioblastomes par rapport à DR4^{65,68}.

TRAIL-R3/DcR1 et TRAIL-R4/DcR2 semblent agir comme des leurres car ils inhibent l'apoptose induite par TRAIL lorsqu'ils sont surexprimés. Ils présentent une homologie proche du domaine extracellulaire de DR4 et DR5 mais ne possèdent pas de « vrai » domaine de mort DD. Celui-ci étant absent (DcR1) ou tronqué (DcR2)^{69,63}. Ces récepteurs ne peuvent donc pas transduire de signal apoptotique car ils ne possèdent pas de domaine de mort. Leur fonction est d'attirer le ligand TRAIL et de le séquestrer au niveau de la membrane lipidique. Ils empêchent ainsi la liaison de TRAIL sur les récepteurs DR4 et DR5, inhibant l'activation des caspases et protégeant les cellules de l'apoptose (Figure 11).

5.3 Voie de signalisation médiée par TRAIL

L'apoptose peut être déclenchée par des signaux qui suivent deux voies, appelées respectivement voie extrinsèque et voie intrinsèque, qui diffèrent par leurs étapes primaires mais convergent ensuite pour activer une petite famille d'enzymes protéolytiques appelées caspases. Ce nom vient du fait que ces enzymes sont des protéases à cystéine dans le site actif, qui clivent leur substrat au niveau de résidu acide aspartique. Chacune des voies initie l'apoptose en activant une caspase initiateur qui active par clivage des caspases effectrices communes (les caspases 3 et 7), qui effectuent ensuite les clivages conduisant aux manifestations de l'apoptose.

La voie extrinsèque de l'apoptose constitue un des mécanismes par lesquels les cellules infectées par des virus sont tuées par les lymphocytes T cytotoxiques et par leurs équivalents de l'immunité innée, les cellules tueuses naturelles NK. Le signal peut être déclenché par TRAIL. La fixation du ligand induit la formation d'un complexe autour de la région cytoplasmique, qui comprend des molécules adaptatrices et la procaspase 8 ou la procaspase 10. Ces (pro)caspases ont une activité faible mais suffisante pour mûrir par clivage des molécules avoisinantes en caspases hautement actives. Les caspases 8 et/ou 10 mûries vont ensuite activer par protéolyse les procaspases effectrices, déclenchant une cascade amplificatrice qui conduit à l'apoptose⁷⁰.

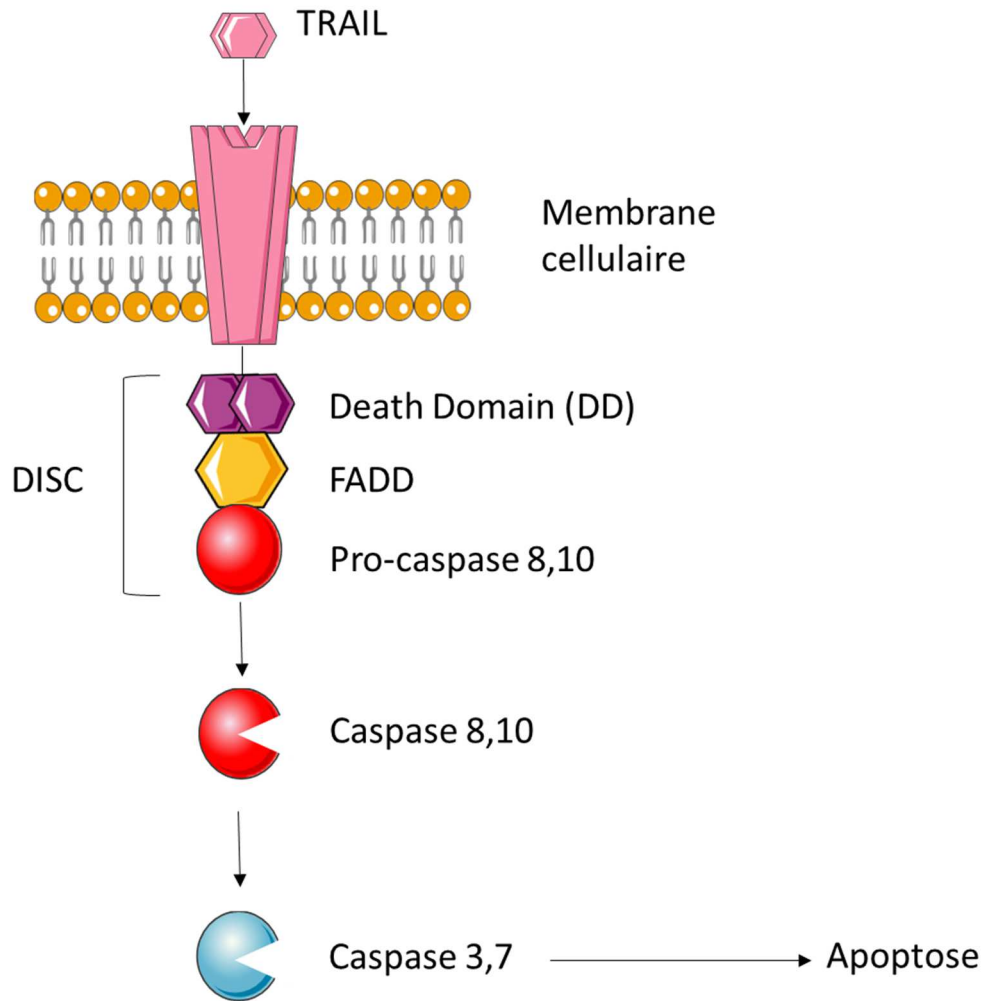


Figure 12 : Voie extrinsèque de l'apoptose induite par TRAIL. Lors de la liaison du ligand trimérisé à 3 de ses récepteurs, ceux-ci envoient un signal au travers de la membrane plasmique et induisent la dimérisation de leur domaine de mort DD. Cela permet le recrutement de protéines adaptatrices telles que la protéine du domaine de la mort associée au FAS (FADD) pouvant activer les caspases initiateuses (caspase-8 et caspase-10). La caspase-8 et la caspase-10 devenues actives clivent et activent ensuite les effecteurs caspase-3 et caspase-7, conduisant à l'apoptose.

L'induction de l'apoptose par TRAIL commence par sa liaison à DR4 ou DR5, induisant leur trimérisation et leur activation. La trimérisation des DDs permet le recrutement d'une molécule adaptatrice, FADD (*Fas Associated Death Domain*), pour activer la caspase-8. FADD est une protéine intracellulaire de 245 acides aminés possédant un domaine de mort en C-term et un domaine effecteur de mort en N-term. Le domaine effecteur de mort permet le recrutement des caspases. FADD se lie donc aux DD des récepteurs de TRAIL par interaction homophile des DD et recrute ensuite la caspase-8, toujours par interaction homophile des DD, tout cela mène à l'assemblage du complexe inducteur de mort (*death-inducing signaling complex*, DISC) ^{63,70,71}. DISC est composé de protéines adaptatrices FADD et des caspases initiateuses qui, par une cascade de clivages, vont former des caspases actives et induire l'apoptose à proprement dite (figure 12).

II. OBJECTIFS DU TRAVAIL

Le glioblastome est la tumeur cérébrale primaire la plus fréquente et la plus agressive chez les adultes. La résection chirurgicale suivie d'une radiothérapie et/ou d'une chimiothérapie constitue le traitement standard. En dépit de l'amélioration des traitements, les patients atteints de glioblastome ont un mauvais pronostic, principalement en raison de la récurrence de la tumeur. Il a été récemment montré dans un modèle de xénogreffe que les cellules du glioblastome peuvent échapper à la masse tumorale et envahir spécifiquement les zones sous-ventriculaires (SVZ) du cerveau adulte. Ces cellules expriment CXCR4 et sont attirées par le CXCL12 sécrété par les cellules de la SVZ. Malgré de nombreux efforts, les agents moléculaires ciblés n'ont jusqu'à présent pas amélioré la survie des patients de manière significative, justifiant la recherche de nouvelles approches parmi lesquelles l'utilisation des virus oncolytiques. En raison de son génome de grande taille, de son cycle infectieux rapide et du fait que, si nécessaire, il peut être contrôlé par l'acyclovir, le virus de l'herpès simplex (HSV) a été modifié de manière à ne se répliquer que dans les cellules tumorales et utilisé comme virus oncolytique (oHSV).

Le but de ce présent travail est de générer un oHSV armé d'une séquence sTRAIL codant pour une protéine soluble activant la voie extrinsèque de l'apoptose et ce, dans les cellules souches de glioblastome. L'expression de cette protéine sera médiée par l'activation d'un promoteur nestine spécifique des cellules souches neuronales. En préambule et avant toute construction en HSV, il sera nécessaire de valider la construction en utilisant un virus vecteur plus simple à manipuler. Les gènes d'intérêt seront insérés en Lentivirus, permettant ainsi une évaluation rapide de la fonctionnalité des constructions, avant de les insérer dans le génome de l'Herpès simplex, le BAC fHSVQuick-1.

III. MATERIEL

1 Lignées cellulaires

Les différents types cellulaires (hormis la lignée U87 CXCR4⁺nih2) utilisés sont cultivés dans du milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Lonza) complété avec 10 % de sérum fœtal bovin (FBS, Gibco) préalablement décomplémenté. Les cellules sont incubées à 37°C en 5% de CO₂.

1.1. Cellules HEK293T Lx1B4

Les cellules HEK293T Lx1B4 sont des cellules embryonnaires de rein humain facilement transfectables et permettant un haut taux d'expression de particules virales.

1.2. Cellules U87 CXCR4⁺nih2

Les cellules U87 CXCR4⁺nih2 (A.Chevigné, LIH, Luxembourg) sont des cellules épithéliales dérivées de cellules gliales d'un glioblastome humain surexprimant le récepteur cxcr4. Ces cellules sont cultivées dans du milieu DMEM complété avec 15 % de FBS préalablement décomplémenté, additionné de généticine (200 µg/ml) et de puromycine (0,5 µg/ml).

1.3. Cellules LN18

Les cellules LN18 (ATCC 2610) sont des cellules épithéliales dérivées de cellules gliales d'un glioblastome humain de grade IV.

1.4. Cellules T98G

Les cellules T98G (ATCC 1690) sont des cellules fibroblastiques dérivées d'un glioblastome multiforme.

1.5. Cellules HADF

Les cellules HADF sont des cellules fibroblastiques matures de peau humaines venant directement d'un donneur (lignées primaires).

2. Plasmides lentiviraux utilisés

Virus	Caractéristique	Carte plasmide (Vector Builder)
LV_pNES_GFP(blasti)	Lentivirus encodant la GFP sous le contrôle d'un promoteur nestine.	pLV_pNES_GFP(blasti) (Annexe 1)
LV_pCMV_TRAIL(blasti)	Lentivirus encodant la forme complète de la protéine TRAIL sous le contrôle d'un promoteur CMV.	pLV_pCMV_TRAIL(blasti) (Annexe 2)
LV_pNES_TRAIL(blasti)	Lentivirus encodant la forme complète de la protéine TRAIL sous le contrôle d'un promoteur nestine.	pLV_pNES_TRAIL(blasti) (Annexe 3)
LV_pNES_sTRAIL(blasti)	Lentivirus encodant la forme soluble de la protéine TRAIL sous le contrôle d'un promoteur nestine.	pLV_pNES_sTRAIL(blasti) (Annexe 4)

Table 1 : Liste des lentivirus utilisés et leurs caractéristiques

3. Tampons

3.1. Tampon de lyse RIPA

Ce tampon est utilisé pour la lyse cellulaire nécessaire à la récupération des protéines totales. Il est composé de : 50 mM de Tris-HCl pH 7,5 ; 150 mM de NaCl ; 1 mM d'EDTA ; 1% de NP40 (Roche) et 0,25% de DOC (Deoxycholate de sodium). Des inhibiteurs protéases (Complete, Roche) et des phosphatases (ThermoScientific) sont ajoutés à ce tampon avant la réalisation de la lyse cellulaire.

3.2. Tampon de migration

Ce tampon est utilisé pour la migration des protéines lors d'électrophorèses sur gel de polyacrylamide. Sa composition est la suivante : 50 mM De Tris pH 8,65 ; 192 mM de glycine et 3,5 mM de dodécylsulfate de sodium (SDS).

3.3. Tampon de transfert

Ce tampon est utilisé pour le transfert des protéines sur les membranes de polyfluorure de vinylidène (PVDF ; GE Healthcare). Il se compose de 25 mM de Tris pH 8,4 ; 192 mM de glycine et 20% de méthanol.

3.4. Tampon de chargement

Ce tampon est utilisé pour le chargement des extraits protéiques totaux sur gel de polyacrylamide. Sa composition est la suivante : 10 mM de Tris-HCl pH 6,8, 1% de SDS, 25% de glycérol, 0,1 mM de β -Mercaptoéthanol et 0,03% de bleu de bromophénol.

3.5. PBS

Le PBS (*Phosphate-buffered saline*) est un tampon isotonique non-toxique pour les cellules. Il est utilisé pour le lavage des cellules. Il se compose de 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na_2PO_4 ainsi que de 1,8 mM de KH_2PO_4 . Son pH est de 7,4.

3.6. TBS

Le TBS (*Tris-buffered saline*) est également un tampon isotonique non toxique. Il est couramment utilisé avec 5% de Tween lors d'un western blot afin de laver les membranes PVDF ainsi que pour la dilution des anticorps. Ce tampon contient 20 mM de Tris et de 150 mM de NaCl. Son pH est ajusté à 7,6 à l'aide de HCl.

3.7. TAE

Le tampon TAE (Tris-Acetate-EDTA) est typiquement utilisé lors d'électrophorèses sur gel d'agarose pour séparer les acides nucléiques. Il se compose de 40 mM de Tris-acétate et de 1 mM d'EDTA, le tout est amené à pH 8,0.

4. Milieux

4.1. Milieu M9

Le milieu M9 est composé de 42 mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 22 mM de KH_2PO_4 , 18,7 mM de NH_4Cl et 8,55 mM de NaCl. Le milieu est autoclavé avant utilisation.

4.2. Milieu minimal M63

Ce milieu sert de milieu de base pour les boîtes de Pétri. La composition pour un litre de milieu en concentration 5 fois est la suivante : 76 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 500 mM de KH_2PO_4 , 9mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Le pH est ajusté à 7 avec du KOH et le tout est autoclavé.

4.3. Milieu LB

Le milieu LB (*Lysogeny broth*) est un milieu utilisé pour la culture bactérienne. Il se compose de 10g/L de bacto-tryptone, de 5g/L d'extraits de levures et de 10 g/L de NaCl.

5. Gel de polyacrylamide

La composition de ce type de gel est reprise dans le tableau ci-dessous :

	Gel de concentration (4%)	Gel de séparation (10%)	Gel de séparation (15%)
H₂O	3,05 mL	5,642 mL	4,082 mL
Tris-HCl pH 8,8	-	1,25 mL	3 mL
Tris-HCl pH 6,8	3 mL	-	-
AcrylBis 37,5/1 40% (Fisher Scientific)	519 µL	3,11 mL	4,67 mL
SDS 10%	50 µL	120 µL	120 µL
APS 10% (Persulfate d'ammonium)	120 µL	120 µL	120 µL
TEMED (SIGMA)	8 µL	8 µL	8µL
Volume Total	5 mL	12 mL	12 mL

Table 2 : Composition d'un gel de polyacrylamide

6. Anticorps utilisés

Anticorps primaires	Provenance	Dilution pour WB	Dilution pour IF
Anti-TRAIL (rabbit, polyclonal)	Abcam	1/2000	1/500
Anti-PARP (rabbit, 46D11)	Cell Signaling	1/1000	-
Anticorps secondaires	Provenance	Dilution pour WB	Dilution pour IF
Anti-Rabbit rouge Alexa 568nm	Invitrogen	-	1/400
Anti-Rabbit	Cell Signaling	1/3000	-

Table 3 : Liste des anticorps utilisés

7. Oligonucléotides utilisés

Les différents primers utilisés sont repris dans le tableau ci-dessous :

Nom	Séquence
Foward galk	5'-GAC-TCA-GGA-CAT-CGG-CGT-GTC-CTT-TTG-GGT-TTC-ACT-GAA-ACT-GGC-CCG- CGC-TGT-TGA-CAA-TTA-ATC-ATC-GGC-A-3'
Reverse galk	5'-ACC-CTA-AAC-CAC-CCG-CGC-TGG-CTT-TTT-ATC-CAC-ATC-GCG-CAG-GGG-TGG- GGT-CAG-CAC-TGT-CCT-GCT-CCT-T-3'
Forward sTrail	5'-GAC-TCA-GGA-CAT-CGG-CGT-GTC-CTT-TTG-GGT-TTC-ACT-GAA-ACT-GGC-CCG- CGC-CCT-GAA-GAG-TTT-GTG-ATC-CTG-AG-3'
Reverse sTrail	5'-ACC-CTA-AAC-CAC-CCG-CGC-TGG-CTT-TTT-ATC-CAC-ATC-GCG-CAG-GGG-TGG- GGG-AGT-TAG-CCA-ACT-AAA-AAG-GCC-CC-3'
Reverse sTrail loxP	5'-ACC-CTA-AAC-CAC-CCG-CGC-TGG-CTT-TTT-ATC-CAC-ATC-GCG-CAG-GGG-TGG- <u>GGA-TAA-CTT-CGT-ATA-GCA-TAC-ATT-ATA-CGA-AGT-TAT-GAG-TTA-GCC-AAC-TAA-</u> AAA-GGC-CCC-3'
UL38polyAFor	5'-ACT-CGT-GGT-TCG-TTG-ACC-CG-3'
promICP6Rev	5'-CGA-CAG-CCA-AAG-AAG-ATA-GGC-G-3'
PromNestRev	5'-CAC-ATG-CAG-ATT-CCC-ACA-GTC-G-3'
Fw-sTRAIL	5'-GTG-AGA-GAA-AGA-GGT-CCT-CAG-3'
seq-sT-Fw	5'-TGA-GGA-AAT-CCT-GTC-CAA-GAT-TT-3'
revsTRAIL	5'-TTC-CCT-CTC-GCC-AAT-GAG-3'

Table 4 : Liste des oligonucléotides utilisés

IV. METHODES

1. Maxipréparation de plasmide

Cette méthode permet d'extraire une grande quantité d'ADN sous forme plasmidique provenant d'une culture bactérienne *Escherichia coli* transformées avec un plasmide déterminé. La maxipréparation est réalisée selon le protocole du kit provenant de la firme Macherey-Nagel (*kit nucleobond Xtra Midi*, ref : 740410.50). La purification quant à elle est réalisée selon le kit *DNA, RNA and protein purification (finisher)*, ref : 740434.50) de la même firme. La concentration d'ADN sous forme plasmidique dès lors obtenue est mesurée au Nanodrop (ThermoScientific) avant d'être filtré sous hotte à flux laminaire sur une membrane de porosité 0,1 µM avec une seringue de 3 mL. La concentration en ADN de l'échantillon filtré est à nouveau mesurée au Nanodrop (ThermoScientific) et la taille du plasmide est vérifiée par une migration sur gel d'agarose 1%.

2. Production de particules lentivirales de seconde génération

Cette méthode permet la production en grande quantité de lentivirus de seconde génération à partir d'une transfection plasmidique au phosphate calcique sur des cellules productrices. Dans ce système, les 3 plasmides utilisés encodent toute la machinerie nécessaire à la génération de lentivirus délévés des gènes de virulence vpr, vif, vpu et nef.

2.1. Transfection

Un million de cellules sont mises en culture dans une flasque de culture de 175 cm². Après 72 heures de croissance, le milieu de culture est renouvelé et les cellules sont transfectées avec les 3 plasmides suivants : le *Packaging plasmid* (PspAX2), le plasmide *Env* (VSV-G) et le plasmide comprenant la cassette à transférer (*LTR-Psi-Promoter-Gene of interest-LTR*). 24 heures post-transfection, le milieu de culture est renouvelé et le surnageant de culture comprenant les particules virales est collecté 48, 72 et 96h après transfection.

2.2. Concentration et titration des particules virales

Afin d'enlever les fragments cellulaires, le surnageant est filtré sur des membranes de porosité de 0,45 µm. Au filtrat est ajouté de la DNase (diluée 5000x) et du MgCl₂ (dilué 1000x), les tubes sont ensuite centrifugés pour éliminer les résidus cellulaires éventuels après une incubation de 20 minutes à 37°C. Après concentration par ultracentrifugation, les particules virales sont titrées selon le protocole du kit *qPCR Lentivirus Titration* (ABM, ref : LV900), aliquotées et stockées à -80°C.

3. Transduction

Les cellules sont mises en culture maximum 18 heures avant la transduction de façon à ce qu'elles soient adhérentes et à 80-90 % de confluence. Les virus sont ensuite ajoutés selon la MOI indiquée (*Multiplicity of infection*) en présence d'un agent de transduction, la protamine sulfate (4 mg/mL, dilué 500x).

4. Analyse de la viabilité au bleu de trypan

La coloration des cellules mortes au bleu de trypan est une méthode classique de numération cellulaire. Afin d'assurer un comptage total du puit de culture cellulaire, le surnageant est prélevé dans un tube Eppendorf d'1,5 mL. Les cellules sont rincées au PBS puis détachées de leur support par l'ajout de trypsine-EDTA. Elles sont ensuite récoltées avec du milieu de culture dans le tube contenant le surnageant de culture. Le comptage des cellules est effectuée via des lames de comptage cellulaire (*Cell Counting Slides*, Biorad) lues par un compteur cellulaire (*TC20 Automated Cell Counter*, Biorad).

5. Western blotting

5.1. Lyse cellulaire (extraits totaux)

Les cellules adhérentes sont remises en suspension puis centrifugées 5 minutes à 200 rpm. Après un rinçage au PBS et une seconde centrifugation, les culots cellulaires sont lysés avec 40 µL de RIPA et incubés sur glace durant 30 minutes. Après une dernière centrifugation de 5 minutes à 6000 rpm à 4°C, les surnageants sont transférés dans un nouveau tube Eppendorf d'1,5 mL. Le dosage protéique est réalisé selon la méthode de Bradford avec le réactif Biorad selon le protocole Biorad. Les absorbances sont déterminées avec et le lecteur de plaque Multiscan MS Labsystems.

5.2. Chargement, migration et révélation

30 µg d'extraits protéiques sont incubés dans du tampon de chargement et bouillis à 100°C durant 5 minutes. Les protéines sont ensuite séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide dans du tampon de migration avant d'être transférées sur une membrane de PVDF (GE Healthcare). Les membranes sont ensuite saturées dans une solution de TBST-Tween contenant 5% de BSA (*Bovin Serum Albumin*) durant au moins une demi-heure puis sont incubées dans une solution de TBST-Tween contenant 5% de BSA additionné des anticorps indiqués ci-dessus (table 3) durant une heure. Après cette incubation, les membranes sont rincées trois fois cinq minutes dans du TBST-Tween avant d'être incubées dans une solution de TBST-Tween contenant 5% de BSA et les anticorps secondaire indiqués ci-dessus (table 3). Les membranes subissent ensuite trois nouveaux lavages avant la révélation. Les protéines étudiées sont détectées à l'aide d'une solution ECL préparée au laboratoire ainsi que la caméra ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare).

6. Immunofluorescence

Des cellules sontensemencées sur des lames couvre-objet. Quarante-huit heures après transfection ou transduction, les cellules sont fixées durant 10 minutes à 37°C avec de la PAF (paraformaldéhyde) 4%. Ces cellules sont ensuite perméabilisées dans du PBS contenant 0,1% de Triton X-100 durant 10 minutes à 37°C avant d'être saturées dans une solution de PBS contenant 5% de BSA durant une demi-heure à 37°C. Après une incubation d'une nuit à température ambiante dans une solution d'anticorp primaire dilué dans du PBS + 5% BSA (voir tableau 4), les cellules sont lavées deux fois à l'aide de PBS +5% BSA puis incubées dans la solution d'anticorps secondaires dilué dans du PBS + 5% BSA durant une heure à température ambiante. Après un nouveau lavage dans du PBS + 5% BSA, les cellules sont

rincées à l'eau désionisée puis les noyaux sont marqués durant dix minutes avec du Hoecht 33342 (ACROS Organics) dilué 1/50.000. Après trois lavages à l'eau désionisée, les lames couvre-objet sont montées sur des lames en verre avec du Mowiol (Fluka Analytical). Les images sont obtenues à l'aide d'un microscope confocal Olympus FV1000 en utilisant un objectif à huile 60x.

7. Réaction en chaîne par polymérase (*Polymerase Chain Reaction ; PCR*)

Deux polymérases différentes ont été utilisées au cours des réactions : la « *High Proof High Fidelity enzyme* » (Biorad) pour l'amplification des cassettes d'insertion et la « *Go Taq G2 polymerase* » (Promega) pour le screening des colonies. Les amorces utilisées sont listées dans la table 4 et sont employées à une concentration finale de 10 µM. Les dNTPs sont utilisés à une concentration finale totale de 10 mM. Pour l'amplification des cassettes d'insertion, la dénaturation initiale a lieu durant 30 secondes à 98°C. Trente-cinq cycles sont ensuite réalisés dans les conditions suivantes : dénaturation durant 10 secondes à 98°C, fixation des amorces durant 30 secondes à 68 °C et extension durant une minute trente à 72°C. La dernière étape d'élongation a lieu durant 5 minutes à 72°C. Les échantillons sont maintenus à 4°C jusqu'à utilisation. Pour les PCR sur colonies, la première étape de dénaturation a lieu durant 5 minutes à 95°C et est suivie de 35 cycles avec une étape de dénaturation de 30 secondes à 95°C, suivie d'une étape de fixation des amorces de 30 secondes à 58°C et d'une étape d'élongation de deux minutes à 72°C. La dernière étape d'élongation a également lieu durant 5 minutes à 72°C et les échantillons sont ensuite conservés à 4°C jusqu'à utilisation.

8. Electrophorèse sur gel d'agarose

Cette technique est couramment utilisée pour séparer des molécules d'ADN selon leur taille et leur conformation. Le gel est constitué d'1% d'agarose (Carl Roth) dissout dans du tampon TAE. On ajoute également du Midorigreen (Filter Service) dilué 1/100.000. Lorsque le gel est polymérisé, les échantillons additionnés de tampon de chargement sont chargés sur le gel parallèlement à une échelle de poids moléculaire « *Gene Ruler DNA Ladder Mix* » (Thermo Scientific). Une tension électrique de 90 volts est appliquée durant la migration.

9. Génération de bacmides recombinants

Ce protocole décrit la manière d'utiliser la sélection positive et négative de *galk* pour réaliser une modification de BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) (insertion dans le cas présent). Il s'agit d'un système de sélection en deux étapes : Tout d'abord, la cassette *galk*, présentant à ses extrémités des régions d'homologie à une position déterminée du BAC. L'insertion de cette cassette permet aux bactéries recombinantes de croître sur un milieu

minimal contenant le galactose comme unique source de carbone. Cette première étape est donc une étape de sélection positive. Ensuite, lors de la seconde étape, la cassette *galk* est substituée par un produit de PCR. La sélection se fait cette fois de manière négative contre la cassette *galk* par résistance au 2-deoxy-galactose (DOG) présent dans le milieu minimal dont la seule source de carbone est le glycérol. La sélection négative s'explique par le fait que le DOG est un produit non toxique à moins d'être phosphorylé par le produit de *galk*. Cette phosphorylation induit la phosphorylation du DOG en 2-deoxy-galactose-1-phosphate, une molécule non métabolisable par les bactéries, empêchant ainsi leur croissance.

Cette technique repose sur l'utilisation d'une lignée particulière d'*E. coli* : la souche SW102. Cette souche contient dans son génome le système de recombinaison du phage λ , c'est-à-dire les gènes *exo*, *bet* et *gam* sous le contrôle d'un répresseur sensible à la température, *c1857*. Le gène *exo* code pour une 5'-3' exonucléase qui génère des extrémités cohésives sur les extrémités 3' de la cassette d'insertion. Le gène *bet* encode une protéine liant ces extrémités cohésives et favorise la recombinaison homologe avec l'ADN complémentaire présent sur le BAC. Le gène *gam* produit un inhibiteur des exonucléases d'*E. coli* pour protéger la cassette de la dégradation. Ce système de recombinaison n'est pas exprimé lorsque les bactéries sont conservées à 32°C⁷².

9.1. Première étape : insertion d'une cassette *galk*

Dans un premier temps, la cassette *galk* est amplifiée par PCR à partir du plasmide pGalk en utilisant la polymérase « *High Proof High Fidelity enzyme* » (Biorad). Les amorces utilisées sont conçues de manière à ce que la cassette *galk* soit entourée de bras d'homologie au BAC fHSVQuick-1 (d'une longueur de 50 paires de bases) complémentaires à la région se trouvant de part et d'autre du site à modifier. 50 μ L du produit de PCR sont ensuite digérés par 1 μ L de l'enzyme DpnI de manière à éliminer tout résidu de plasmide pGalk (template). Cette enzyme digère les fragments d'ADN méthylés, ce qui est le cas pour le plasmide bactérien mais pas du produit de PCR.

Ensuite, une pré-culture d'*Escherichia coli* de souche SW102 contenant le BAC d'intérêt est préparée dans 5 mL de milieu LB contenant 12.5 μ g/mL de chloramphénicol. Cette culture est incubée durant la nuit sous agitation à 32°C. Le lendemain, 500 μ L de cette pré-culture sont dilués dans 25 mL de LB + chloramphénicol et incubés à 32°C sous agitation jusqu'à atteindre une densité optique (OD₆₀₀) de 0,6. Lorsque la bonne DO est atteinte, les bactéries subissent un choc thermique à 42°C durant exactement 15 minutes après quoi elles sont placées dans un bain d'eau glacée pendant 10 minutes. La culture est ensuite

centrifugée durant 10 minutes à 2100G 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est délicatement re-suspendu dans 25 mL de ddH₂O glacée. Une fois le culot complètement re-suspendu, la culture subit une nouvelle centrifugation avant un second lavage identique. Après un rinçage avec 10 mL de glycérol 10% glacé, le culot est maintenu re-suspendu dans 1 mL de glycérol 10% glacé et transféré dans un tube Eppendorf d' 1,5 mL avant d'être centrifugé à vitesse maximale durant une minute. Le surnageant est éliminé et le culot est conservé sur glace jusqu'à la prochaine étape.

Les bactéries rendues dès-lors électro-compétentes sont transformées par électroporation avec le produit de PCR dans une cuvette de 0.1 cm (Biorad) à 25 µF, 1,75 kV et 200 Ω. Après électroporation, on laisse une période de récupération d'une heure aux bactéries dans 1 mL de LB sous agitation à 32 °C. Les bactéries sont alors lavées trois fois dans une solution saline de M9 avec centrifugation d'une minute à 15.700 g entre les lavages. Après le troisième lavage, le surnageant est éliminé et le culot est re-suspendu dans 1mL de M9 avant que 50 µL de cette solution ne soient étalés sur boîtes de Petri contenant du milieu minimal M63 avec du galactose (1%), de la L-leucine (1%), de la d-biotine (1/5000) et du chloramphénicol. Après trois jours d'incubation à 32°C, 8 clones sont analysés par PCR et les produits sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose afin de déterminer la présence ou non de la cassette *galk*. Les colonies ayant incorporé la cassette sont étalées par striation sur des boîtes de Pétri contenant du milieu McConkey et du chloramphénicol.

9.2. Deuxième étape : remplacement de la cassette *galk* par la cassette contenant le gène d'intérêt

Une pré-culture est réalisée sur la nuit en choisissant une colonie Gal+ (apparaissant rouge foncé sur le milieu McConkey) qui est inoculée dans 5 mL de LB + chloramphénicol et incubée à 32°C. Cette culture est ensuite traitée comme indiqué ci-dessus pour obtenir des cellules électro-compétentes. Parallèlement à cette étape, une cassette de 2896 pb contenant pNES_sTRAIL et une cassette de 2930 pb contenant loxP_pNES_sTRAIL sont amplifiées par PCR. Ces cassettes sont conçues de manière à présenter des régions d'homologie de part et d'autre de la séquence à remplacer. Les bactéries électro-compétentes sont transformées avec le produit de PCR dans les mêmes conditions que la première étape puis sont laissées au repos durant 4h30 dans 10 mL de LB à 32°C et sous agitation. Après cette période de récupération, 1 mL de la solution est prélevé et centrifugé durant une minute à vitesse maximale, le culot est lavé deux fois dans du milieu M9. Le deuxième lavage est suivi par une re-suspension du culot dans 1mL de milieu M9 et 150 µL de cette solution sont étalés sur une boîte de Pétri contenant du milieu M63, du glycérol (1%), de la L-leucine

(1%), de la d-biotine (1/5000), du DOG (1%) ainsi que du chloramphénicol. Les cultures sont incubées durant trois jours à 32°C après quoi, 5 à 6 clones sont analysés par PCR et électrophorèse sur gel d'agarose pour déterminer si le remplacement a bien eu lieu. Les colonies pour lesquelles le remplacement de la cassette *galK* a fonctionné sont enfin étalées sur boîtes de McConkey + galactose + chloramphénicol et incubées une nuit à 32°C. Les colonies Gal- (apparaissant blanches sur les boîtes de McConkey) sont analysées par PCR et séquencées pour confirmer la présence de la mutation désirée.

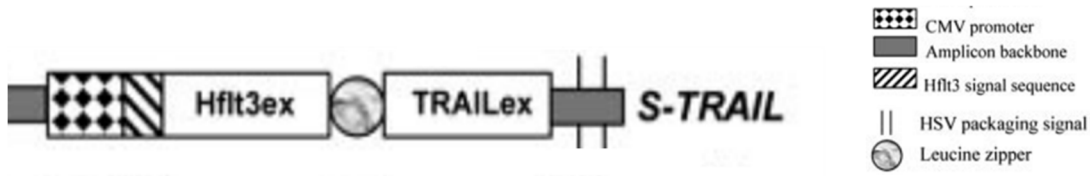


Figure 13 : Vecteur modèle développé par Shah *et al*⁴². Le *backbone* est celui de HSV-1

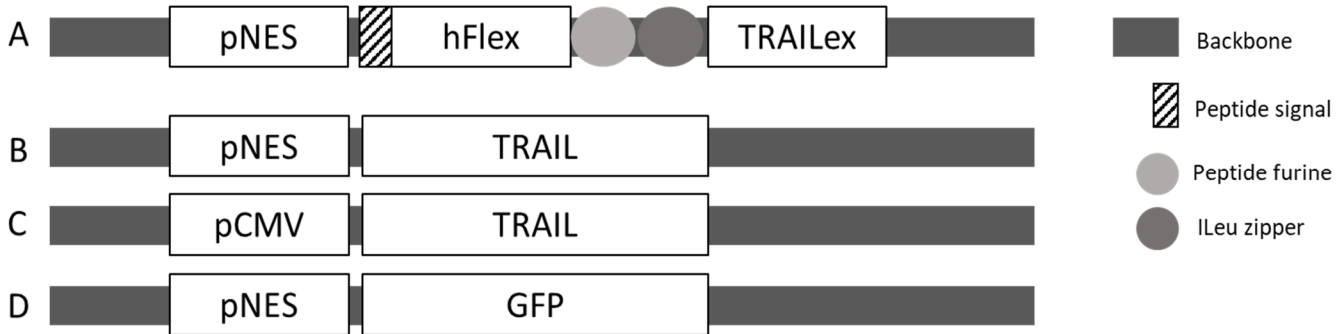


Figure 14 : Liste des plasmides lentiviraux générés. (A) cassette sTRAIL encodée par le plasmide pLV_pNES_sTRAIL, (B) forme complète de TRAIL sous le contrôle du promoteur nestin du plasmide pLV_pNES_TRAIL, (C) forme complète de TRAIL sous le contrôle du promoteur CMV du plasmide pLV_pCMV_TRAIL, (D) séquence de la GFP (green fluorescent protein) sous le contrôle du promoteur nestin du plasmide pLV_pNES_GFP.

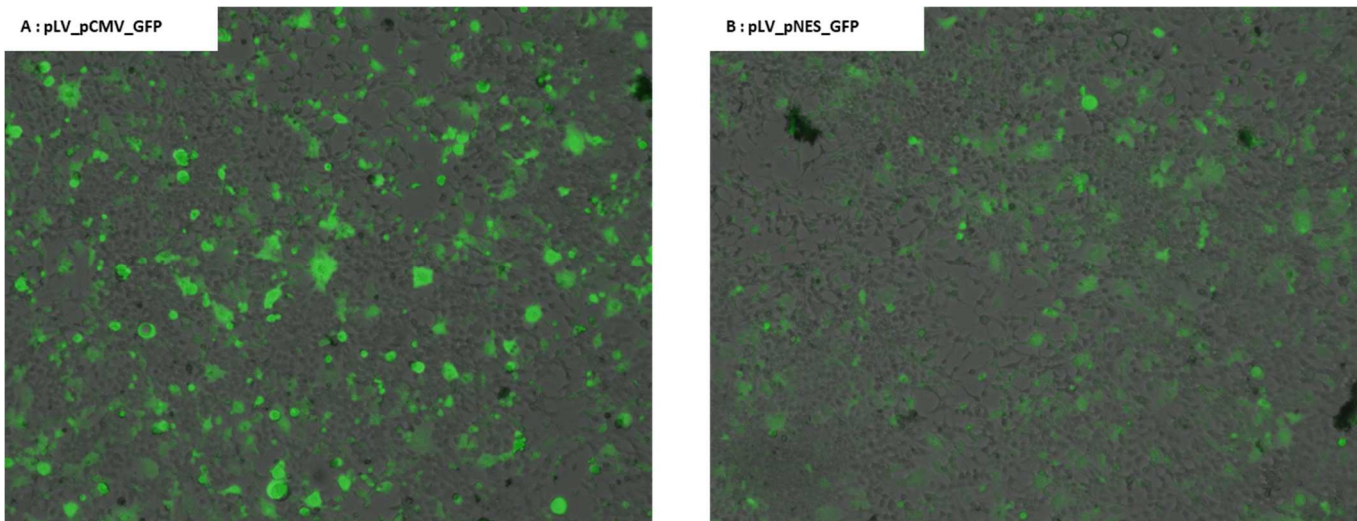


Figure 15 : Les cellules HEK 293T Lx1B4 expriment le promoteur nestine. Des cellules HEK 293T Lx1B4 ont été transfectées avec les plasmides (A) pLV_pCMV_GFP et (B) pLV_pNES_GFP. 48 heures après transfection, des photos ont été prises en microscopie à contraste de phase au grossissement 4x. Le filtre GFP est superposé à l'image des cellules (overlay).

V. RESULTATS

1 *Design d'un plasmide lentiviral encodant la forme soluble de TRAIL*

En 2003, l'équipe américaine de Khalid Shah⁴² a développé un vecteur exprimant une forme active et sécrétée de la protéine TRAIL. Cette nouvelle forme, présentée en figure 13, est codée par différentes séquences favorisant l'activité apoptotique de la protéine de fusion. Cette protéine nommée sTRAIL a un effet « boule de neige » sur les cellules environnantes lors de sa sécrétion. Dans ce présent travail, nous nous sommes inspirés de ce modèle afin de générer la séquence ADN de la cassette pNES_sTRAIL (figure 14A). Tout d'abord, cette cassette comprend la partie N-term du domaine extracellulaire de Flt3L (acides aminés 1 à 81), un ligand pour le récepteur de la tyrosine kinase Flt3L lié à un peptide signal. Cette séquence nommée hFlex permet la sécrétion de la protéine par la cellule. A cela nous avons ajouté en N-term, une séquence isoleucine zipper de 34 acides aminés qui favorisera et stabilisera la trimérisation *in vitro* de la protéine de fusion. L'activité cytolytique de la protéine sera donnée par la séquence du domaine extracellulaire de TRAIL (acides aminés 95 à 281). Enfin, nous avons ajouté une séquence codant pour un peptide furine qui, selon Xiaofeng Wu et Kam Hui⁴⁴ permet le clivage par l'endoprotéase furine entre hFlex et TRAILex. Ces auteurs ont en effet démontré que l'activité apoptotique de sTRAIL est augmentée une fois la partie hFlex clivée. Cette séquence codant pour la forme active et sécrétée de TRAIL a été mise sous le contrôle d'un promoteur nestine composé de la séquence du promoteur hsp68 lié à celle codant pour le 2nd intron de la nestine chez le rat. L'ensemble de la cassette pNES-sTRAIL ainsi générée est longue de 2793 pb et est intégrée dans un plasmide lentiviral de seconde génération (VectorBuilder). La protéine de fusion correspondant à la séquence présente une taille théorique de 46,12 KDa. Le séquençage de cette cassette nous a permis de s'assurer que le plasmide comprend bien les nucléotides 124 à 969 (correspondant aux résidus 95 à 281) de la forme soluble de TRAIL.

Parallèlement, nous avons également généré les plasmides pLV_pNES_TRAIL et pLV_pCMV_TRAIL permettant de vérifier l'expression de la forme complète et non modifiée de TRAIL (figure 14B et 14C), mais aussi pLV_pNES_GFP (figure 14D). Ce dernier nous permettra d'analyser l'expression de la GFP sous le contrôle du promoteur nestine lors de transfections et transductions en cellules eucaryotes. Ces différents plasmides ont été utilisés comme contrôles dans les différentes expériences.

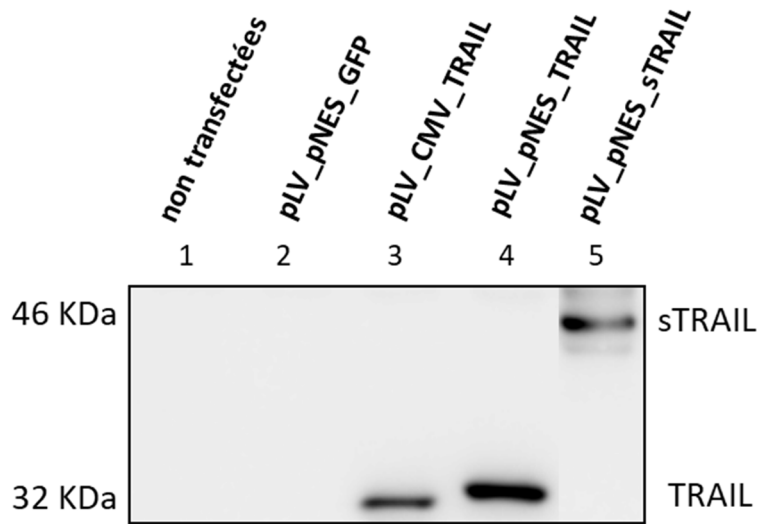


Figure 16 : Le plasmide pLV_pNES_sTRAIL induit la production de la forme modifiée de TRAIL. Des cellules HEK Lx293T ont été transfectées avec les plasmides pLV_pNES_GFP (2), pLV_pCMV_TRAIL (3), pLV_pNES_TRAIL (4) et pLV_pNES_sTRAIL (5). Le puit (1) correspond à des cellules non transfectées. 24h après transfection, les cellules ont été récoltées, lysées et un western blot a été réalisé avec les extraits cellulaires totaux. Un anticorps polyclonal anti-TRAIL permet de détecter la forme complète et soluble.

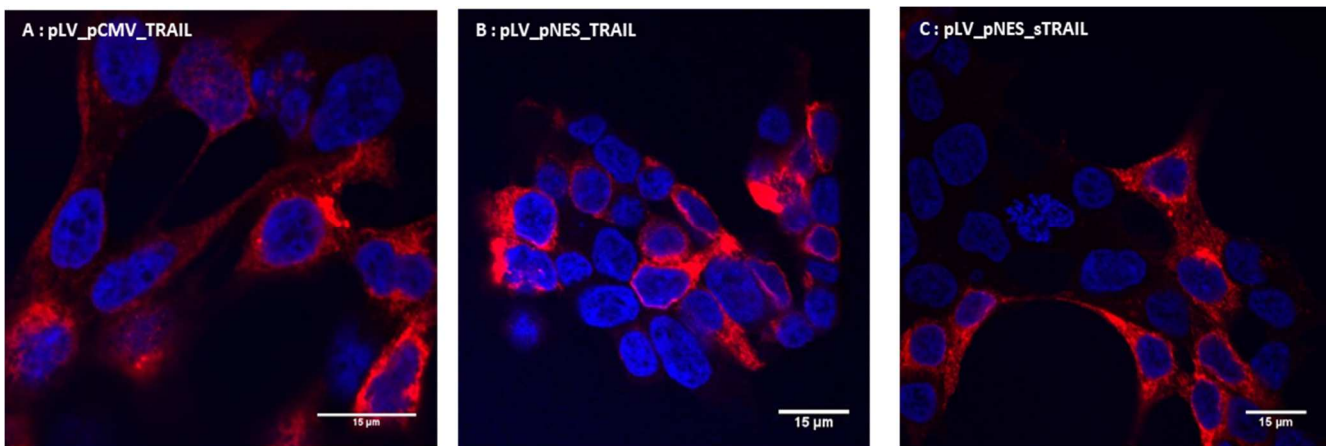


Figure 17 : La protéine TRAIL ou sTRAIL est exprimée dans le cytoplasme. Analyse par microscopie confocale de cellules HEK Lx293T transfectées avec les plasmides pLV_pCMV_TRAIL (A), pLV_pNES_TRAIL (B) et pLV_pNES_sTRAIL (C). Les noyaux sont marqués avec du Hoechst (bleu), l'anticorps reconnaissant la partie C-term de TRAIL est révélé par un anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa 568 émettant dans le rouge.

2 Expression de sTRAIL dans des cellules eucaryotes

Dans un premier temps, nous avons réalisé une transfection de nos différents plasmides sur des cellules HEK293T Lx1B4. Comme contrôle de transfection, nous avons utilisé un plasmide lentiviral encodant la GFP sous le contrôle du promoteur CMV. Quarante-huit heures après transfection, nous observons que les cellules transfectées avec le plasmide contrôle sont bien vertes (figure 15A). Etonnamment, les cellules transfectées avec le plasmide pNES_GFP sont également vertes (figure 15B). Afin d'observer l'expression des protéines GFP, TRAIL et sTRAIL, les différents plasmides ont ensuite été transfectés selon la méthode au phosphate calcique dans des cellules HEK293T Lx1B4 en plaque de culture 6 puits. Après 24 heures de transfection, les cellules ont été récoltées, lysées et 30 µg d'extrait protéique ont été ajoutés dans les puits d'un gel de polyacrylamide. Après migration et transfert sur membrane PVDF, la membrane saturée a été incubée avec un anticorps anti-TRAIL reconnaissant la partie C-term de TRAIL (acides aminés 114-281) (figure 16). Les cellules transfectées avec le plasmide pLV_pCMV_TRAIL expriment la protéine TRAIL complète, avec un poids moléculaire de 32 KDa démontrant que le promoteur CMV est bien actif en HEK293T Lx1B4. Les cellules transfectées avec le plasmide pLV_pNES_TRAIL expriment également la protéine TRAIL, ce qui indique que le promoteur nestine est également actif dans les cellules HEK293T Lx1B4. Néanmoins, nous remarquons une légère différence de poids moléculaire entre les bandes des puits 3 et 4 (pLV_pCMV_TRAIL et pLV_pNES_TRAIL), la bande du puit 3 apparaissant plus basse en taille par rapport à la bande du puit 4. Cela est inattendu car nous avons inséré la même séquence d'ADN dans les deux plasmides. Seul le promoteur est différent. Dans les cellules transfectées avec pLV_pNES_sTRAIL, nous détectons une bande à la taille d'environ 46 KDa correspondant à la taille théorique de la de fusion sTRAIL.

Afin de déterminer la présence et la localisation cellulaire des protéines TRAIL et sTRAIL, nous avons réalisé un immunomarquage des cellules HEK transfectées avec les plasmides pLV_pCMV_TRAIL, pLV_pNES_TRAIL et pLV_pNES_sTRAIL. Les noyaux ont été marqués en bleu avec le Hoechst et les cellules ont été incubées en présence d'un anticorps primaire dirigé contre la partie C-term de TRAIL, puis d'un anticorps secondaire (couplé à l'Alexa 568, un fluorochrome émettant dans le rouge). L'observation des lames par microscopie confocale (figure 17) nous indique que les protéines TRAIL et sTRAIL sont exprimées par une proportion importante des cellules et présentent une localisation cytosolique des protéines et une concentration dans la zone qui pourrait correspondre à l'appareil de Golgi.

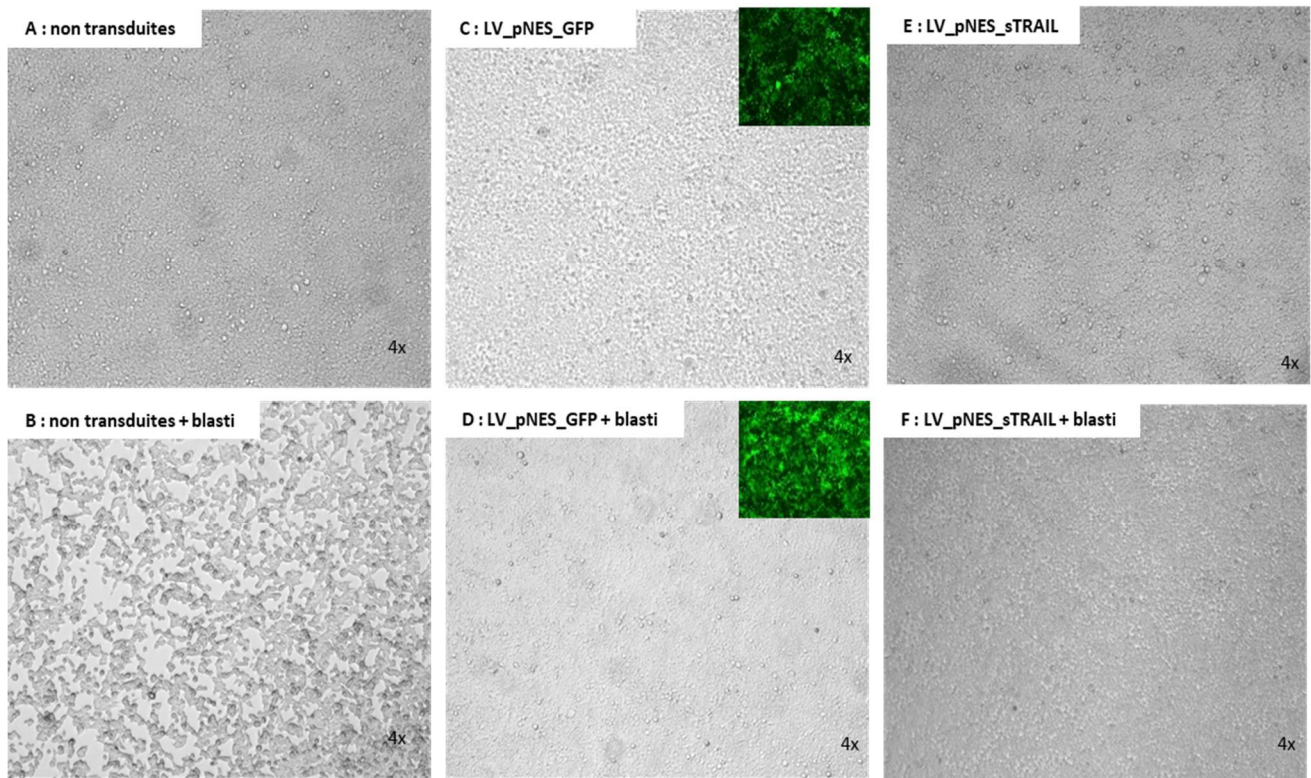


Figure 18 : Les cellules transduites acquièrent une résistance à la blasticidine. 10 μ L de surnageant de culture contenant des particules virales ont été ajouté sur des cellules HEK Lx293T traitées ou non avec blasticidine (5 μ gr/mL). Les puits de culture cellulaire ont été photographiés 72h après traitement. A : HEK non transduites et non traitées, B : HEK + blasticidine, C : HEK + LV_pNES_GFP, D : HEK + LV_pNES_GFP + blasticidine, E : HEK + LV_pNES_sTRAIL, F : HEK + LV_pNES_sTRAIL + blasticidine.

Virus	Titre (TU/mL)
LV_pNES_GFP	1.88E+08
LV_pCMV_TRAIL	1.32E+08
LV_pNES_TRAIL	2.53E+08
LV_pNES_sTRAIL	4.05E+08

Tableau 5 : Titration des particules virales en *transducing units* par mL

3 Production de particules lentivirales de seconde génération

Comme la transfection nous a permis de confirmer la construction correcte des plasmides, nous avons réalisé une production de particules virales en co-transfectant des cellules HEK293T Lx1B4 avec les plasmides de packaging, d'enveloppe et ceux codant pour les protéines d'intérêt. Après 3 jours de récolte quotidienne des surnageants de culture contenant les particules virales, nous avons testé 10 μ L de surnageant sur des cellules HEK293T Lx1B4 en plaque de culture 24 puits. Parallèlement, les cellules transduites ont été traitées à la blasticidine afin de déterminer si celles-ci acquièrent la résistance à l'antibiotique codée par les particules virales. Septante-deux heures après l'ajout de l'antibiotique, les cellules non transduites apparaissent plus rondes et souffrent de la présence de la blasticidine (figure 18B) contrairement aux cellules transduites avec les particules virales (figures 18D et 18F).

Après cette vérification attestant de la présence de particules virales dans les surnageants de culture récoltés, ces surnageants ont été concentrés et une titration a été réalisée par qRT-PCR en collaboration avec la plateforme Viral Vectors (tableau 5). Les tubes Eppendorfs contenant les virus (3 x 100 μ L par virus) ont été congelés à -80°C.

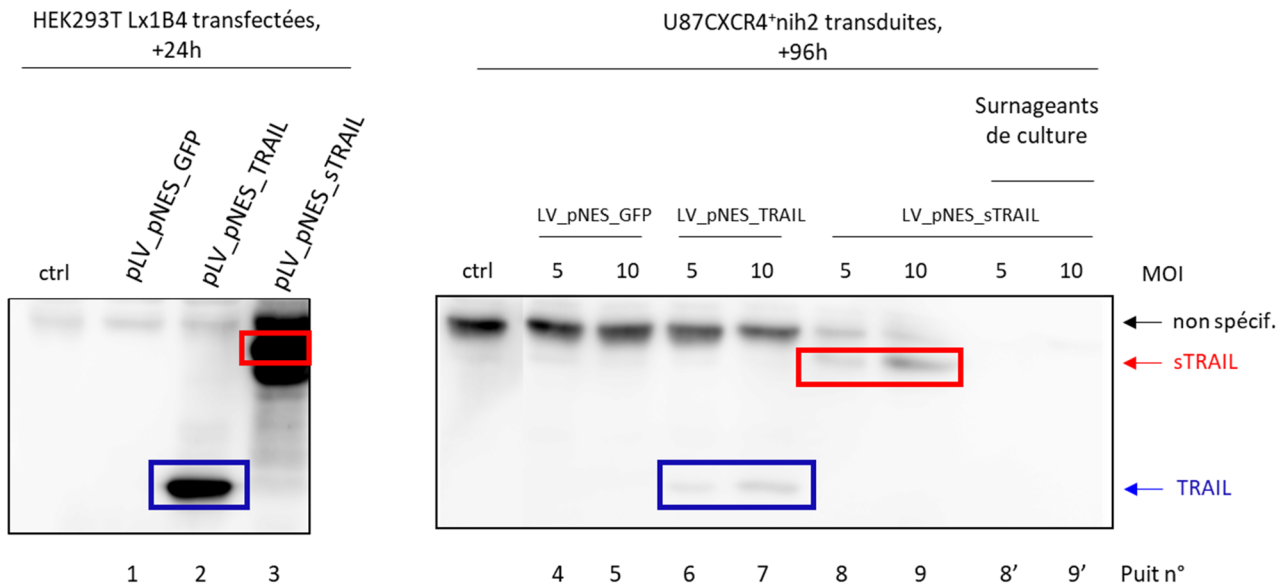


Figure 19 : La protéine sTRAIL est exprimée par les cellules transduites. Comme contrôles, des cellules HEK ont été transfectées avec les plasmides pLV_pNES_GFP (1), pLV_pNES_TRAIL (2) et pLV_pNES_sTRAIL (3). Les cellules U87^{cxcr4+} ont été transduites avec les virus LV_pNES_GFP MOI=5 (4), MOI=10(5), LV_pNES_TRAIL MOI=5 (6), MOI=10 (7), LV_pNES_sTRAIL MOI=5 (8), MOI=10 (9). 24h après transfection et 96h après transduction, les cellules ont été récoltées, lysées et un western blot a été réalisé avec les extraits cellulaires totaux. Les surnageants de culture correspondant au puits 8 et 9 ont été concentrés avant le chargement dans le puit. Un anticorps polyclonal anti-TRAIL permet de détecter la forme complète et soluble sur la membrane.

4 Analyse de la transduction du virus LV_pNES_sTRAIL sur des cellules U87 CXCR4⁺nih2

Dans le but de caractériser l'expression de la protéine sTRAIL induite par le lentivirus LV_pNES_sTRAIL, des cellules U87 CXCR4⁺nih2 ont été transduites avec les virus LV_pNES_GFP, LV_pNES_TRAIL et le virus LV_pNES_sTRAIL aux MOI de 5 et 10. Parallèlement, des cellules HEK 293T Lx1B4 ont été transfectées avec les plasmides pLV_pNES_GFP, pLV_pNES_TRAIL et le plasmide pLV_pNES_sTRAIL puis traitées de la même manière afin de disposer d'un contrôle de reconnaissance de bande sTRAIL et TRAIL (figure 19). Nonante-six heures après transduction, les cellules U87 CXCR4⁺nih2 ont été récoltées, lysées et 30 µg d'extrait protéique ont été ajoutés dans les puits d'un gel de polyacrylamide. Après migration et transfert sur membrane PVDF, la membrane saturée a été incubée avec un anticorps anti-TRAIL reconnaissant la partie C-term de TRAIL (acides aminés 114-281). Les cellules U87 CXCR4⁺nih2 transduites avec le virus LV_pNES_TRAIL expriment la forme complète de la protéine TRAIL au poids moléculaire attendu de 32 KDa et les cellules transduites avec le virus LV_pNES_sTRAIL expriment la forme soluble au poids moléculaire attendu d'environ 46 KDa (puits 6 à 9). Etant donné que sTRAIL est une forme sécrétée de TRAIL, nous avons ajouté les surnageants de culture concentrés correspondant aux extraits cellulaires des puits 8 et 9 dans les puits 8' et 9'. Nous n'observons pas de bande lors de la révélation. Enfin, nous détectons une bande aspécifique dans chaque puit à un poids moléculaire supérieur à 46 KDa.

Suite à cela, nous avons observé l'effet des différents lentivirus sur des cellules U87 CXCR4⁺nih2 en microscopie à contraste de phase. Pour cela, des cellules U87 CXCR4⁺nih2 cultivées en plaque 12 puits ont été transduites avec les virus LV_pNES_GFP, LV_pNES_TRAIL et LV_pNES_sTRAIL à différentes MOI : 1, 5 et 10 afin d'observer l'effet de la protéine sTRAIL sur ce type cellulaire. Malgré une auto-fluorescence importante des cellules U87CXCR4⁺nih2, nous observons l'expression de la GFP à partir de 72h de transduction à une MOI de 5 et de 48h à une MOI de 10 (figure 20A), confirmant que les lentivirus peuvent efficacement infecter les cellules et que le promoteur nestine est actif dans ce type cellulaire. Le virus LV_pNES_TRAIL (figure 20B) ne semble quant à lui pas induire d'effet sur les cellules transduites contrairement au virus LV_pNES_sTRAIL (figure 20C). Dès 24 heures de transduction à une MOI de 5, nous observons en effet un changement drastique de la morphologie des cellules transduites avec LV_pNES_sTRAIL. Cet effet est dose-dépendante et est d'autant plus marqué que la MOI est élevée.

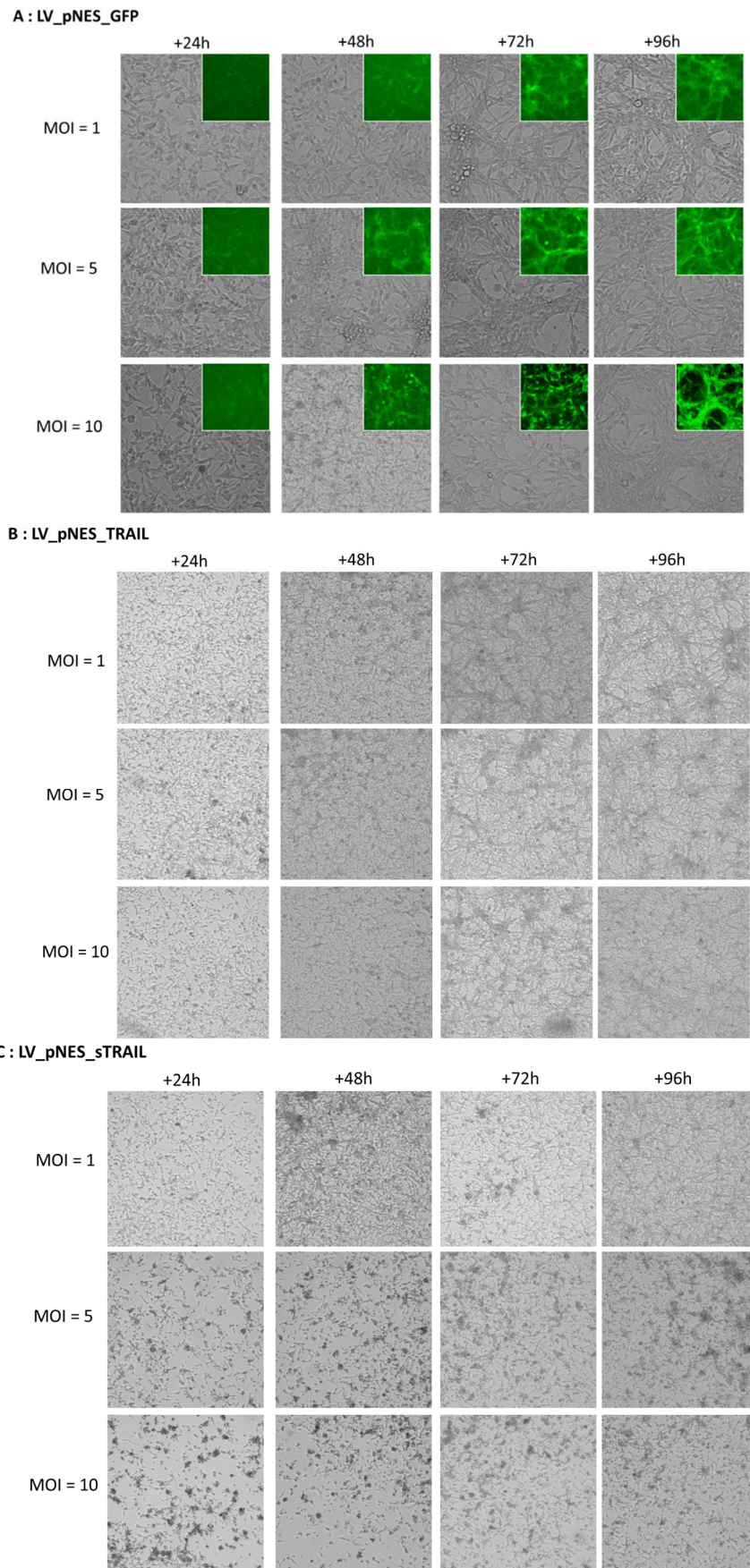


Figure 20 : Le virus LV_pNES_sTRAIL a un effet sur les cellules U87CXCR4⁺nih2. Des cellules U87 cxcr4+nih2 ont été transduites avec les virus LV_pNES_GFP (A), LV_pNES_TRAIL (B) et LV_pNES_sTRAIL (C) à différentes MOI. Les puits de culture ont été photographiés toutes les 24 heures au grossissement 10x.

Afin d'objectiver cette mort cellulaire dans les cellules transduites, nous avons quantifié la viabilité des cellules par le bleu de trypan (figure 21). Des cellules U87 CXCR4⁺nih2 ont été transduites à des MOI de 1, 5 ou 10. Après 24, 48, 72 et 96 heures de transduction, les cellules ont été détachées et nous avons réalisé un comptage des cellules vivantes qui apparaissent non marquées par le bleu de trypan. Parallèlement, des cellules non traitées ont été utilisées comme contrôle négatif (l'agent de transduction n'influençant pas la viabilité, résultat non présenté) et des cellules traitées à la camptothécine à 5 et 10 μ M comme contrôle positif. Cet agent toxique étant un inhibiteur de l'ADN topoisomérase 1, il provoque des cassures d'ADN qui, ne pouvant être réparées, induisent la mort cellulaire. Les barres d'erreurs sur chaque histogramme sont associées aux écarts-types des triplicat interne. Chaque comptage cellulaire fut réalisé 3 fois par puit de cellules infectées. Dans un premier temps, nous remarquons que le virus LV_pNES_GFP n'affecte pas la viabilité des U87 CXCR4⁺nih2 même à une MOI élevée. Il en est de même pour le virus LV_pNES_TRAIL, les cellules surexprimant la forme complète de TRAIL ne semblent pas présenter de mortalité. Par contre, dès 48 heures de transduction avec le virus LV_pNES_sTRAIL à une MOI de 1, nous observons un effet sur la viabilité cellulaire (76,7 % de cellules vivantes). Cet effet est d'autant plus marqué que la MOI est élevé. Seules 6,0 % des cellules sont vivantes après 96 heures d'incubation à une MOI de 10.

A la suite de cette analyse, nous avons récolté des extraits protéiques de chaque condition de culture. Trente microgrammes de chaque extrait a été ajouté dans les puits d'un gel de polyacrylamide et après migration et transfert sur une membrane PVDF, la membrane a été coupée en deux et chaque partie incubée avec soit un anticorps dirigé contre la partie C-term de TRAIL (figure 22A), soit avec un anticorps dirigé contre la forme clivée de PARP (poly ADP-ribose polymérase, figure 22B). PARP est une protéine de 116 KDa dont le clivage menant à une forme de 89 KDa constitue un marqueur de la voie extrinsèque de l'apoptose. D'abord, et malgré la présence de bandes aspécifiques, nous observons la présence de sTRAIL à un poids moléculaire d'environ 46 KDa dans les puits correspondants aux cellules transduites avec les particules virales LV_pNES_sTRAIL. Cette bande n'est pas présente dans l'extrait des cellules transduites à une MOI de 1 et récoltées après 24 heures. Comme attendu, l'intensité de sTRAIL augmente avec le niveau de transduction et le temps d'incubation. Parallèlement à cela, la membrane B a été incubée avec un anticorps dirigé contre PARP. Il apparaît dans chaque puit du gel une bande correspondant à la forme complète de PARP de 116 KDa. Cette protéine est exprimée dans toutes les cellules. Par contre, nous n'observons qu'une bande à un poids moléculaire correspondant à la forme

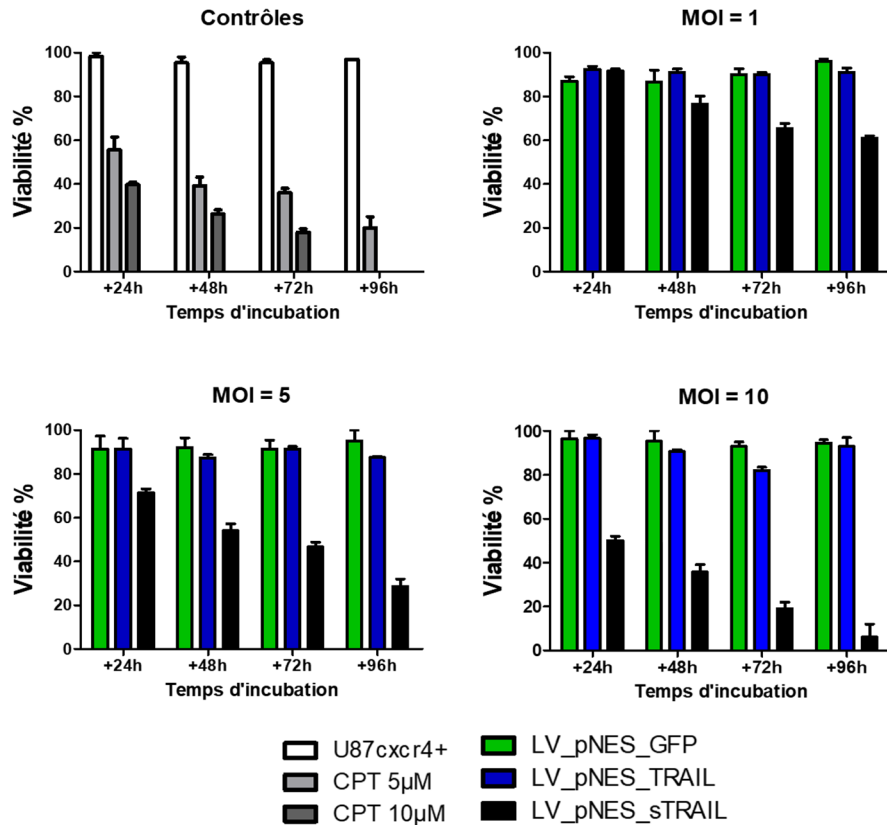


Figure 21 : Le virus LV_pNES_sTRAIL induit la mort cellulaire. Analyse de la viabilité au bleu de trypan. Les cellules U87^{cxc4+} cultivées en plaque de culture 12 puits sont transduites avec les particules virales indiquées en légende. CPT est l'abréviation de camptothécine, un contrôle positif de l'induction de l'apoptose. Les barres d'erreurs verticales correspondent aux écarts-types des triplicats internes.

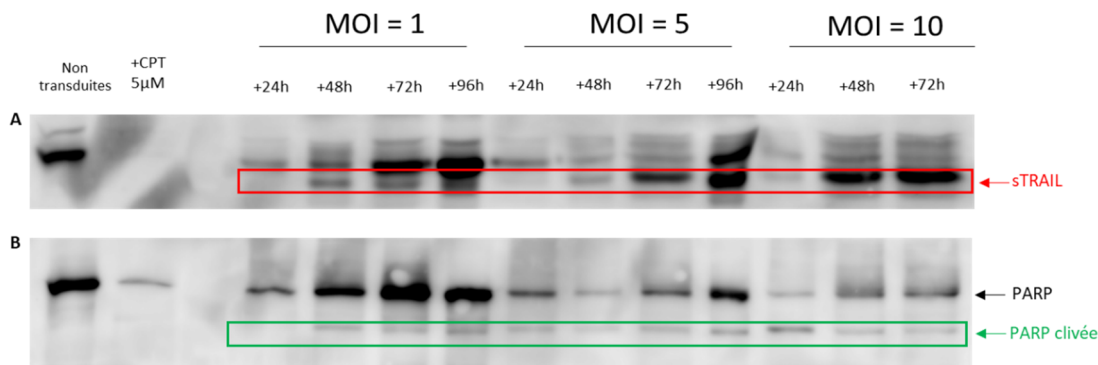


Figure 22 : La production de la protéine sTRAIL induit le clivage de PARP. Des cellules U87cxc4⁺nih2 sont cultivées en plaque de culture 12 puits et transduites avec le virus LV_pNES_sTRAIL à différentes MOI. 24, 48, 72 et 96 heures après incubation, les cellules sont récoltées et lysées. 30 µg d'extrait protéiques sont analysés par westernblot et incubés avec un anticorps anti-TRAIL (A) anti-PARP (B). Comme contrôles, les extraits protéiques de cellules non transduites et de cellules traitées avec 5 µM de camptothécine sont également ajoutés.

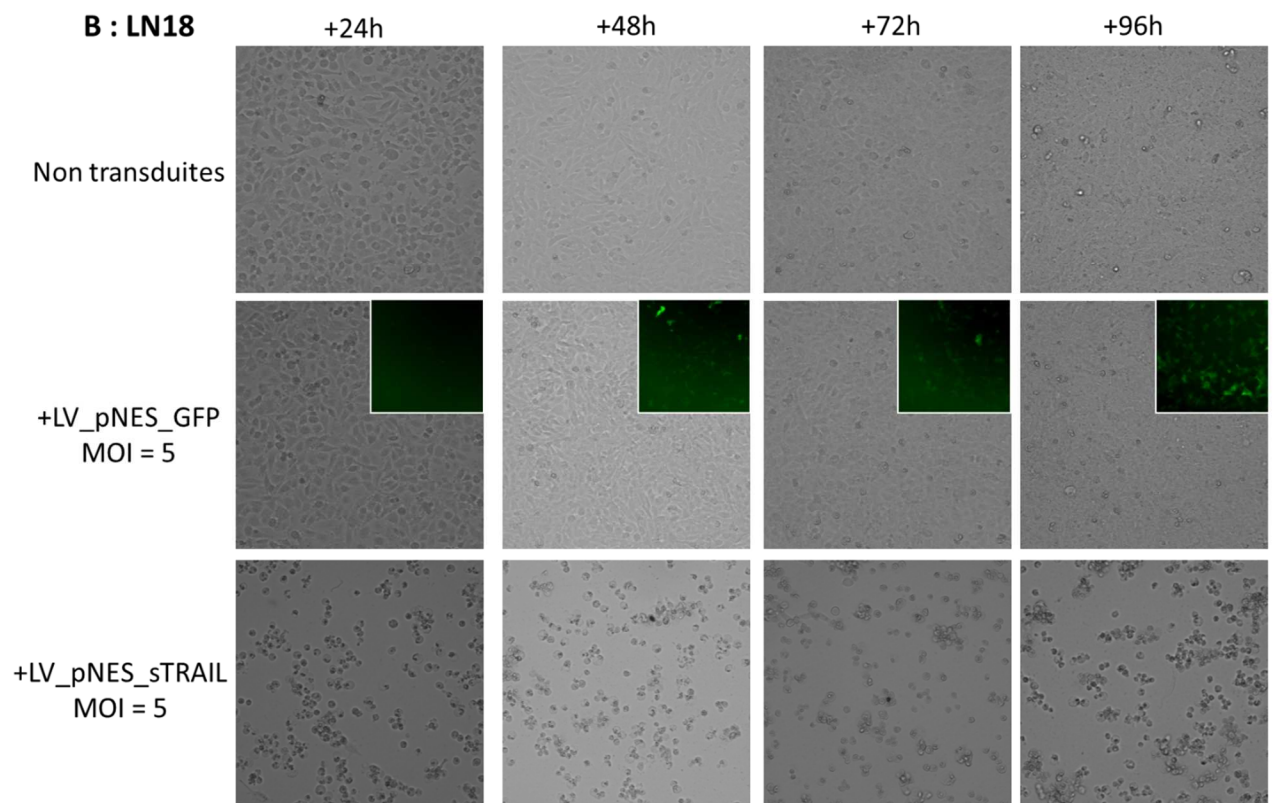
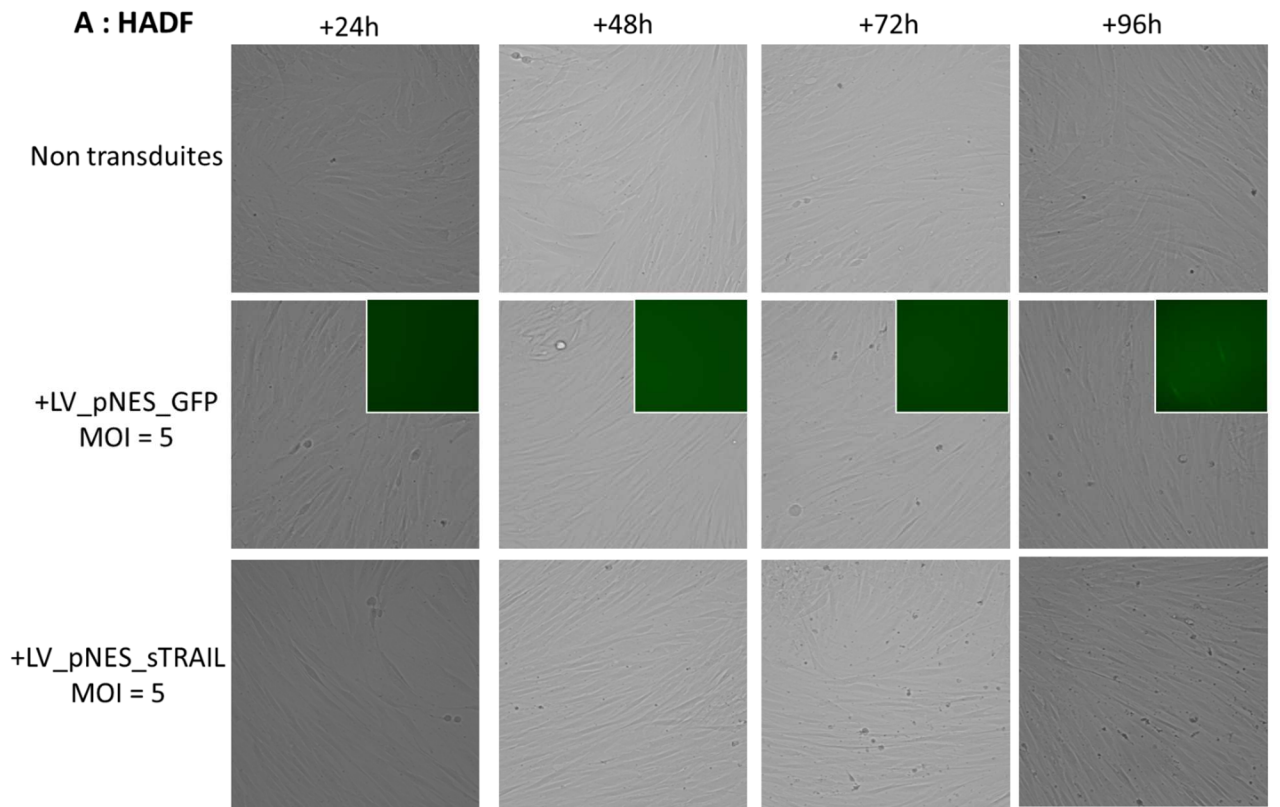
clivée de la PARP dans les puits de cellules transduites. Cette protéine clivée n'est pas retrouvée dans les cellules traitées avec 5 μ M de camptothécine, ni dans les cellules transduites à une MOI de 1 après 24 heures. Il semblerait également que la bande correspondant à PARP clivée augmente en intensité en fonction du temps d'incubation. Afin d'objectiver cela, nous avons réalisé une quantification des bandes du gel. Après 24 heures de transduction à une MOI de 1, 5 et 10, nous obtenons 9,49 ; 52,85 et 81,85 % de PARP clivée.

Ces résultats indiquent que la transduction de cellules U87 CXCR4⁺nih2 avec le virus LV_pNES_sTRAIL induit l'expression de la protéine sTRAIL au-delà de 24 heures à une MOI de 1 et que cette expression induit la mort cellulaire croissante par l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose.

5 Analyse de la spécificité du promoteur nestine

Dans le but d'examiner la spécificité du promoteur nestine, d'autres lignées cellulaires ont été transduites avec les virus LV_pNES_GFP et LV_pNES_sTRAIL à une MOI de 5. Ces cellules ont été cultivées en plaque 12 puits, et après des temps d'incubation de 24, 48, 72 et 96 heures, ces cellules ont été analysées par microscopie à contraste de phase (figure 23) avant d'être récoltées pour un comptage au bleu de trypan (figure 24). Des cellules primaires HADF (*Human Adult Dermal Fibroblast*) fournies par C. Reush ont été utilisées comme contrôle négatif. Aucune expression de GFP n'est détectée dans ces cellules HADF. Par ailleurs, la morphologie des cellules transduites avec un virus induisant l'expression de sTRAIL sous le contrôle du promoteur nestine ne semble pas affectée. Ces résultats confirment les données de la littérature selon lesquelles le promoteur nestine n'est pas actif dans les cellules épithéliales matures (figure 23A).

Nous avons également testé l'activité du promoteur nestine dans deux autres lignées de cellules de glioblastome à savoir les LN18 (glioblastome de grade IV) et les T98G (glioblastome multiforme). Dans ces deux lignées, une légère expression de la GFP est observée suite à la transduction avec le virus LV_pNES_GFP indiquant que le promoteur nestine est actif (figures 23B et C). L'effet de la transduction est plus marqué avec le virus LV_pNES_sTRAIL. Dès 24 heures après transduction, nous observons un effet marqué sur la morphologie des cellules, les cellules T98G présentant une forme plus arrondie en comparaison avec les cellules LN18 qui semblent bien plus affectées. Parallèlement, nous avons analysé au bleu de trypan la viabilité des différents types cellulaires transduits avec le



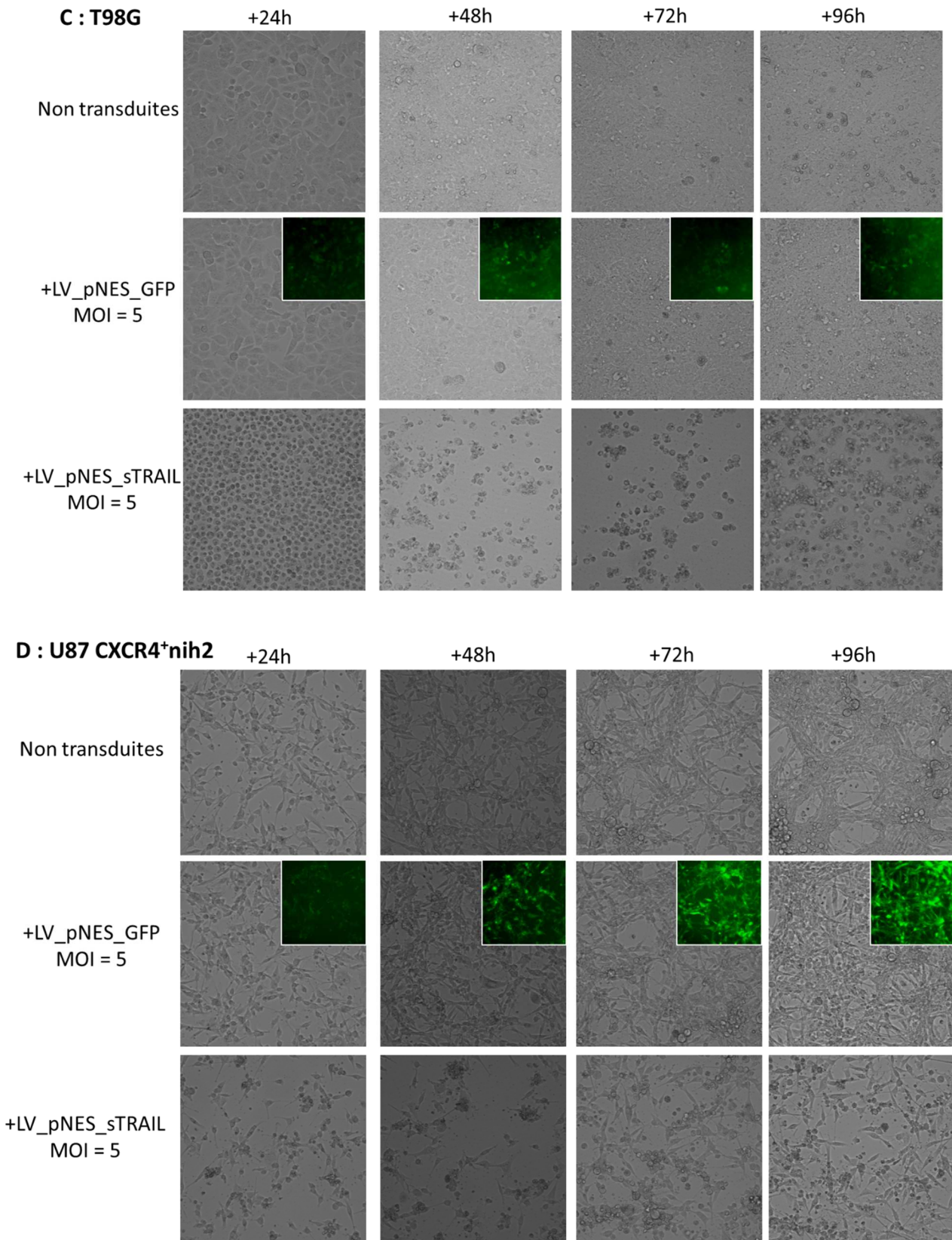


Figure 23 : Le promoteur nestin est actif dans les cellules gliales. Différentes lignées cellulaires ont été transduites avec les virus LV_pNES_GFP et LV_pNES_sTRAIL à une MOI de 5. Les puits de culture ont été pris en photos toutes les 24 heures après transduction au grossissement 10x. (A) : HADF, *Human Adult Dermal Fibroblast*, lignée primaire. (B) : LN18, glioblastome de grade IV. (C) : T98G, glioblastome multiforme. (D) : U87CXCR4⁺nih2 glioblastome.

virus LV_pNES_sTRAIL à une MOI de 5. Comme attendu au vu des observations en microscopie optique (figure 23A), la viabilité des cellules HADF n'est pas affectée par la transduction, confirmant que le promoteur nestine n'est pas actif dans ces cellules. Par contre, nous observons une viabilité décroissante des cellules U87 CXCR4⁺nih2 au cours du temps jusqu'à atteindre 29,5 % après 4 jours d'incubation. L'effet semble encore plus marqué pour les cellules LN18 et T98G dont la viabilité cellulaire est drastiquement affectée dès 24 heures d'incubation. Pour chacune des 4 lignées cellulaires, nous avons analysé en parallèle la viabilité suite à la transduction par le virus LV_pNES_GFP. Le virus n'affecte pas la viabilité cellulaire (résultats non montrés).

Le promoteur nestine est bel et bien actif dans les lignées cellulaires de glioblastomes. La protéine sTRAIL y est exprimée et induit la mort cellulaire.

6 Génération d'un herpès virus oncolytique encodant la cassette pNES_sTRAIL

Après avoir démontré l'action de notre cassette pNES_sTRAIL dans un système lentiviral, nous avons entrepris l'intégration de cette cassette pNES_sTRAIL dans le bacmide BAC fHSVQuick-1, dans le but de générer un herpès virus armé de sTRAIL.

La première étape est l'intégration d'une cassette *galk* codant pour une galactokinase en lieu et place de la zone où notre cassette pNES_sTRAIL sera intégrée, c'est-à-dire entre les gènes UL38 et ICP6. A partir d'un plasmide pGalk encodant la séquence de la galactokinase, nous avons réalisé une PCR avec les primers ForwardGalk et Reverse Galk (table 4). La séquence ainsi amplifiée présente des bouts flottant à ses extrémités pouvant s'intégrer par recombinaison homologue dans le BAC fHSVQuick-1 (annexe 6). Cette intégration fut réalisée en transformant des bactéries SW102 rendues compétentes comme décrit à la page 19. Ces dernières ont étéensemencées sur gélose M63 dont la seule source de carbone est le galactose. Les clones obtenus sont donc ceux ayant intégré la séquence permettant d'exprimer l'enzyme pour l'utilisation de ce sucre. Un *screening* des clones par PCR a été effectué en utilisant les primers UL38polyAFor et un primer interne à la séquence *galk*, le résultat de ce *screening* démontre la bonne intégration de la séquence à l'endroit déterminé dans le BAC (table 4, figure 25).

Pour la seconde étape qui consiste à remplacer la cassette *galk* par la cassette pNES_sTRAIL, nous avons amplifié la cassette pNES_sTRAIL à partir du plasmide

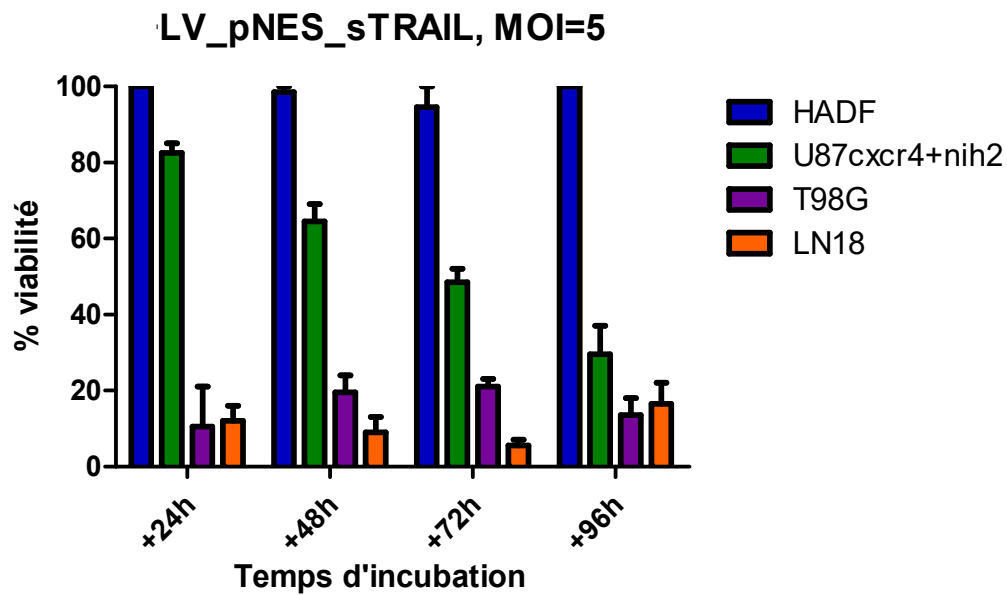


Figure 24 : L'expression de la protéine sTRAIL induite par le virus LV_pNES_sTRAIL cause la mort des cellules neuronales. Analyse de la viabilité cellulaire au bleu de trypan. Les différentes lignées cellulaires sont cultivées en plaque de culture 12 puits et transduites le virus LV_pNES_sTRAIL à une MOI de 5. Les barres d'erreurs verticales correspondent aux écarts-types des triplicats internes.

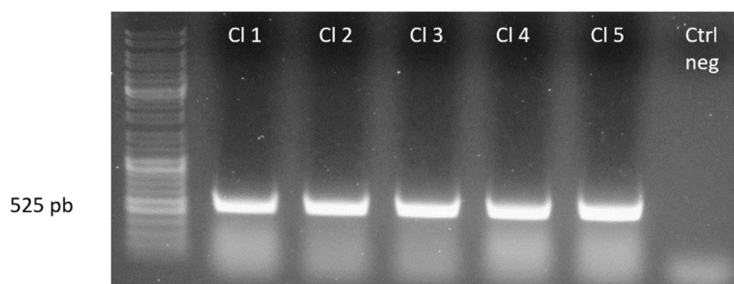


Figure 25 : La cassette *galk* est correctement intégrée dans le BAC fHSV-Quik-1. Screening des clones ayant poussé sur géloses M63 après transformation par PCR.

pLV_pNES_sTRAIL avec les primers Forward sTrail, Reverse sTrail et Reverse sTrail loxP (table 4). Ce dernier oligonucléotide permet l'insertion d'un site loxP qui permettra des modifications ultérieures sur la construction ainsi obtenue. Suite à la transformation des cassettes pNES_sTRAIL et loxP_pNES_sTRAIL dans les bactéries SW102 comprenant le BAC fHSVQuick-1/*galK*, nous avonsensemencé les bactéries sur des plaques de culture DOG. Malheureusement, le *screening* des clones obtenus ne fut pas concluant, les cassettes n'ayant pas été intégrées.

VI. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le glioblastome multiforme (GBM) est la forme la plus courante et la plus agressive de tumeur cérébrale primaire maligne. A l'heure actuelle, il est très difficile de traiter les patients atteints de GBM. Leur survie étant de 12 à 18 mois après une résection chirurgicale. Ce mauvais pronostic reflète l'urgence de développer de nouveaux traitements. Une des alternatives aux traitements conventionnels et qui a déjà fait ses preuves dans le contexte du GBM est l'utilisation de virus oncolytiques, dont oHSV. La stratégie mise en place dans le laboratoire de virologie-immunologie du GIGA en collaboration avec le laboratoire des maladies du système nerveux et thérapies du professeur B. Rogister (GIGA-Neurosciences) est de développer un oHSV ciblé et armé contre le GBM qui pourra être directement injecté dans l'espace tumoral, au niveau de la zone sous-ventriculaire *in vivo*. Cette approche consiste à rediriger le virus en modifiant la glycoprotéine de surface gD afin qu'elle exprime une partie de CXCL12, un ligand du récepteur CXCR4 exprimé par les cellules souches de glioblastome, et de l'armer avec un gène dont le produit est capable d'induire l'apoptose. Ce présent travail s'inscrit dans ce contexte et consiste à armer un herpès virus oncolytique d'un gène codant pour une forme soluble de la protéine TRAIL. Afin d'armer oHSV contre les cellules souches cancéreuses, nous nous sommes inspirés du travail réalisé par plusieurs équipes qui, en 2003, ont développé une forme soluble de TRAIL dénommée sTRAIL^{42,44}. En nous basant sur ces différents travaux, nous avons développé une forme modifiée en intégrant une séquence de clivage furine et la protéine de fusion ainsi générée fut placée sous le contrôle d'un promoteur nestine. Il est établi que les cellules souches du système nerveux central en développement expriment fortement la nestine²³. L'expression du gène codant pour cette protéine semble être fortement associée à l'état des cellules pro-génitrices du SNC. L'importance de ce promoteur est donc primordiale dans notre contexte, le but final de l'étude étant l'injection du virus directement dans la zone sous-ventriculaire d'un patient atteint de GBM, sTRAIL ne pourra être exprimé que dans les cellules immatures en forte division. Les cellules saines et matures du cerveau adulte seront ainsi protégées.

Etant donné que l'intégration d'un transgène dans un bacmide recombinant (ici le BAC fHSVQuick-1) est une tâche difficile due à la grande taille du génome et du temps d'obtention des clones, nous avons préalablement testé notre construction en lentivirus de seconde génération grâce à la plateforme Viral Vectors. Ces rétrovirus modifiés sont un outil très utile pour tester rapidement l'effet de notre transgène et la spécificité du promoteur, les techniques sont également optimisées et nécessitent un minimum de protection. La

première étape de ce présent travail a donc été le *design* d'un plasmide lentiviral encodant la forme soluble de la protéine TRAIL sous le contrôle du promoteur nestine, nommée pNES_sTRAIL. Plusieurs plasmides ont été générés pour assurer tous les contrôles positifs et négatifs nécessaires (VectorBuilder). Lors d'une première transfection des plasmides sur des cellules HEK293T Lx1B4, nous avons remarqué que le promoteur nestine y est actif, les cellules transfectées avec pLV_pNES_GFP étant vertes eu microscope à contraste de phase. Les recherches réalisées suite à ce résultat étonnant indiquent que les cellules HEK293 ont des caractéristiques neuronales, exprimant pas moins de 60 gènes neuronaux codant notamment pour des protéines filamenteuses dont fait partie la nestine^{73,74,75}. De plus, ces cellules présentent une résistance à l'apoptose induite par TRAIL, via une forte expression des « decoy » récepteurs de TRAIL (DcR1 et DcR2), une moindre expression du récepteur DR4 et l'activation de la voie NF- κ B⁷⁶. Cela explique que l'expression de sTRAIL suite à la transfection par le plasmide pNES_sTRAIL n'induit pas la mort des cellules HEK293T Lx1B4 (figure 16 E,F).

Suite à cela, nous avons étudié l'efficacité de notre promoteur nestine et vérifié l'expression des protéines TRAIL et sTRAIL dans les cellules HEK293T Lx1B4. Au niveau des cellules transfectées avec les plasmides pLV_pCMV_TRAIL et pLV_pNES_TRAIL, nous avons remarqué une légère différence de taille sur le blot de la protéine TRAIL sous le contrôle des promoteurs CMV et nestine. Cela peut être expliqué par le fait que la séquence peptidique de TRAIL comprend 3 *ORFs* (*Open Reading Frame*, phase de lecture ouverte) dans une même phase de lecture. En plus de la première méthionine, nous en retrouvons deux autres en positions 3 et 4 (annexe 1). La différence de taille pourrait se trouver dans le fait que l'initiation de la transcription de la séquence ADN démarre à la 3^e ou la 4^e méthionine dans les cellules transfectées avec le plasmide pLV_pCMV_TRAIL, amenant les protéines plus légères à une bande plus basse que celles sous le contrôle de pNES. Un autre moyen d'expliquer cela serait de séquencer le gène introduit dans ces plasmides synthétiques. En effet, leur séquence n'ayant pas été contrôlée au laboratoire, il est possible que la séquence TRAIL ait été légèrement modifiée lors de sa génération. Ensuite, en plus de la forme complète de TRAIL, nous détectons sur ce même blot une bande correspondant au poids moléculaire de sTRAIL dans les extraits protéiques des cellules transfectées avec le plasmide pLV_pNES_sTRAIL. Notre protéine de fusion sTRAIL est bien exprimée à la taille attendue et ces résultats ont été confirmés par les images d'immunofluorescence où nous retrouvons l'expression de TRAIL et sTRAIL dans les cellules transfectées. L'analyse de ces images prises en microscopie confocale montre que l'expression de TRAIL et sTRAIL semble être diffuse

dans le cytoplasme avec une concentration au niveau de la zone golgienne. Les cellules HEK293T Lx1B4 ayant un gros noyau et un petit cytoplasme, il est difficile d'observer le contenu cellulaire. Afin d'améliorer les images d'immunofluorescence, nous pourrions utiliser un autre type cellulaire avec un noyau plus petit et un cytoplasme plus facilement observable. Mais étant donné que notre protéine sTRAIL induit l'apoptose, la fixation des cellules devrait être rapide après l'introduction de la séquence exogène et la protéine pourrait ne pas être observable faute de temps d'expression.

Après avoir observé l'efficacité de notre promoteur pNES et l'expression des protéines sous son contrôle dans les cellules HEK293T Lx1B4, nous avons réalisé une production de vecteurs viraux avec l'aide de la plateforme Viral Vectors. Étant donné que les cellules HEK293T Lx1B4 ont acquis une résistance à la blasticidine suite à une transduction de 10 μ L de surnageant de culture, nous avons concentré et titré les particules virales, et obtenu un titre acceptable pour chaque particule virale générée (de l'ordre de 10^8 TU par mL). Suite à la transduction de ces lentivirus à différentes MOI sur des cellules U87CXCR4⁺nih2, nous avons détecté les protéines TRAIL et sTRAIL dans les extraits protéiques, validant une fois de plus notre construction. Néanmoins, nous observons sur chaque membrane une bande aspécifique très proche, au-dessus de la bande sTRAIL, rendant l'analyse du blot des cellules transduites moins aisée que pour les cellules transfectées. Nous pourrions optimiser cela en ajoutant un tag (HA ou V5 par exemple) dans notre séquence tout en s'assurant de ne pas modifier l'activité biologique de celle-ci. Cela nous permettrait d'utiliser un anticorps totalement spécifique de notre protéine de fusion et éviter toute liaison aspécifique de l'anticorps primaire avec le contenu cellulaire. De plus, comme nous avons modifié la protéine TRAIL en une forme soluble, nous nous attendions à détecter celle-ci dans un surnageant de culture concentré. La technique utilisée ici n'étant pas assez sensible pour les protéines sécrétées, nous ne décelons pas sTRAIL dans le surnageant de culture de cellules transduites. Une alternative au western blot serait de réaliser un test ELISA sur le surnageant de culture.

De plus, nous avons pu confirmer l'activité cytolytique de notre protéine de fusion sTRAIL par l'analyse de la viabilité cellulaire au bleu de trypan. Le virus LV_pNES_sTRAIL induit bien la mort cellulaire, contrairement au virus LV_pNES_TRAIL qui ne montre pas d'activité cytolytique. La forme sécrétée permet un effet « boule de neige » sur les cellules environnantes alors que la forme membranaire TRAIL ne peut atteindre les récepteurs cellulaires aux alentours. La mortalité induite par sTRAIL est d'autant plus importante selon la MOI utilisée (1, 5 et 10). Et ce, jusqu'à atteindre une valeur maximale de létalité de 94%

après 96 heures de transduction du virus LV_pNES_sTRAIL à une MOI de 10. Par ailleurs, l'analyse au bleu de trypan nous donne comme résultat la proportion de cellules vivantes et mortes dans un échantillon de cellules en suspension. Il serait plus judicieux à l'avenir d'utiliser un test plus sensible qui nous permettrait directement de déterminer le nombre de cellules en apoptose sans prendre en compte les cellules en nécrose. En effet, le comptage cellulaire au bleu de trypan peut être biaisé par des débris cellulaires, le comptage consistant en une détection optique du bleu de trypan qui rentre dans les cellules mortes. Une technique alternative est la cytométrie en flux, plus précisément, le test Annexin V/PI. Ce test permet une détection bien plus sensible des cellules et le résultat donne une information sur la proportion exacte de cellules vivantes, nécrotiques, apoptotiques et en début d'apoptose dans un échantillon cellulaire. Dans notre étude, c'est le clivage de la PARP qui nous a permis d'affirmer que notre virus LV_pNES_sTRAIL induit l'apoptose des cellules U87CXCR4⁺nih2. Nous remarquons que ce clivage devient d'autant plus important en fonction du temps d'incubation post-transduction.

Ensuite, afin de vérifier la spécificité du promoteur nestine, nous avons transduit d'autres lignées cellulaires avec nos particules virales (les cellules HADF, T98G et LN18). Le promoteur nestine n'est pas actif dans les cellules HADF (*Human Adult Dermic Fibroblast*, lignée primaire de fibroblastes de peau directement extraits chez un patient adulte). En effet, ces cellules transduites avec le virus LV_pNES_GFP ne présentent aucune fluorescence après 3 jours de transduction à une MOI de 5 et ne présentent aucun signe de mortalité induite par sTRAIL. Le promoteur n'est par conséquent, pas actif dans cette lignée cellulaire mature et les cellules HADF peuvent être utilisées comme contrôle négatif de nos constructions virales avec le promoteur pNES. Un autre contrôle négatif que nous pourrions utiliser sont des cellules astrocytaires matures non cancéreuses, bien plus proche de notre modèle. Mais la procuration de ce type cellulaire nécessite un prélèvement intra crânial chez un donneur sain, un acte chirurgical lourd, ce qui n'est pas le cas pour les cellules HADF. Concernant les lignées de glioblastomes LN18 et T98G, on observe une très forte diminution de la viabilité dès 24 heures après l'infection virale. Il semblerait ici que ces cellules soient bien plus sensibles à l'apoptose médiée par sTRAIL que les cellules U87CXCR4⁺nih2. Selon plusieurs études, les glioblastomes présenteraient une résistance plus ou moins forte à l'induction de l'apoptose médiée par sTRAIL de par leur origine cellulaire hétérogène (d'où le nom glioblastome multiforme). Plusieurs mécanismes de résistances dont l'inactivation de la voie JNK pourraient expliquer la différence de mortalité entre les lignées que nous observons ici ^{77,38}.

Enfin, grâce aux différents résultats décrits ci-dessus, nous avons pu valider le modèle d'expression de sTRAIL en lentivirus. sTRAIL induit la mort des cellules issues de glioblastomes via l'activation du promoteur nestine, tout en épargnant les cellules où ce promoteur n'est pas actif.

Etant donné que le but ultime du projet est l'injection d'un HSV oncolytique ciblé et armé dans la zone tumorale du cerveau de patient atteint de GBM, la seconde partie de ce présent travail est l'insertion du transgène dans le bacmide contenant la séquence complète du génome HSV. Notre approche consiste en l'intégration de la cassette pNES_sTRAIL grâce à un protocole couramment utilisé au laboratoire pour la modification de BAC. Ce protocole décrit la manière d'utiliser la sélection positive et négative de *galk* pour réaliser une modification de BAC (insertion dans le cas présent). Il s'agit d'un système de sélection en deux étapes : premièrement, l'insertion de la cassette *galk* en lieu et place de la zone d'intégration de notre transgène et ensuite, le remplacement de cette cassette par le transgène (ici pNES_sTRAIL)⁷². Le BAC utilisé est le BAC fHSVQuik-1, il comprend le génome de la souche MGH1 d'herpès virus avec toutes les modifications nécessaires pour obtenir un virus oncolytique (Δ UL39, Δ γ 1 34.5, P ICP6-EGFP, P CMV-DsRed1)³⁹. Il ne possède pas de délétion du gène TK (thymidine kinase), permettant de préserver l'agressivité du virus mais aussi permettant l'utilisation d'acyclovir en cas de prolifération incontrôlée du virus *in vivo*. Nous avons décidé d'intégrer la cassette de 2793 pb entre les gènes UL38 et ICP6. Contrairement au reste du BAC fHSVQuick-1, cette zone semble ne pas avoir été modifiée et l'intégration d'une séquence exogène ne modifiera pas la bonne expression du génome.

Au terme de ce mémoire, et malgré plusieurs essais, nous ne sommes parvenu au remplacement de la cassette *galk* dans le BAC fHsvQuick-1. Cela peut être expliqué par la grande taille de notre cassette (2793 pb) rendant son insertion bien plus complexe que ce qui fut testé précédemment en laboratoire. Lors des différents essais, 200 ng d'ADN purifié ont été transformés, en vain. L'addition d'une plus grande quantité de la cassette (telle que 500 ng) aurait certainement plus de chance de fonctionner et de générer des clones ayant intégré pNES_sTRAIL. De plus, une meilleure connaissance du modèle fHsvQuick-1 en réalisant un séquençage de celui-ci apporterait également de la lumière sur la carte de ce BAC, permettant ainsi de mieux comprendre son fonctionnement. Une fois la cassette intégrée, il sera nécessaire de caractériser notre bacmide et de refaire toutes les expériences *in vitro* réalisées ici avec ce virus oncolytique armé. Suite à cela, nous pourrons enfin passer à un modèle *in vivo* en se basant sur le modèle expérimental développé par l'équipe de B.

Register consistant en l'injection du virus dans la zone sous-ventriculaire, là où se trouvent les GSC ²³.

VII REFERENCES

1. Kroonen, J. *et al.* Human glioblastoma-initiating cells invade specifically the subventricular zones and olfactory bulbs of mice after striatal injection. *Int. J. Cancer* **129**, 574–585 (2011).
2. Furnari, F., Fenton, T., RM, B. & *et al.* Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* **21**, 2683–2710 (2007).
3. Cai, X. & Sughrue, M. E. Glioblastoma: new therapeutic strategies to address cellular and genomic complexity. *Oncotarget* **9**, 9540–9554 (2018).
4. Ehtesham, M., Winston, J. A., Kabos, P. & Thompson, R. C. CXCR4 expression mediates glioma cell invasiveness. *Oncogene* **25**, 2801–2806 (2006).
5. Goffart, N., Kroonen, J. & Rogister, B. Glioblastoma-initiating cells: Relationship with neural stem cells and the micro-environment. *Cancers* **5**, 1049–1071 (2013).
6. Singh, S. K. *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* **63**, 5821–5828 (2003).
7. Goffart, N. *et al.* CXCL12 mediates glioblastoma resistance to radiotherapy in the subventricular zone. *Neuro. Oncol.* **19**, 66–77 (2017).
8. Veselska, R. *et al.* Nestin expression in the cell lines derived from glioblastoma multiforme. *BMC Cancer* **6**, 32 (2006).
9. Karsten, U. & Goletz, S. What makes cancer stem cell markers different ? 1–8 (2013). doi:10.1186/2193-1801-2-301
10. Dell’Albani, P. Stem cell markers in gliomas. *Neurochem. Res.* **33**, 2407–2415 (2008).
11. Lapidot, T., Dar, A. & Kollet, O. How do stem cells find their way home? *Blood* **106**, 1901–1910 (2005).
12. Capdevila, C., Rodríguez Vázquez, L. & Martí, J. Glioblastoma Multiforme and Adult Neurogenesis in the Ventricular-Subventricular Zone: A Review. *J. Cell. Physiol.* **232**, 1596–1601 (2017).
13. Würth, R., Bajetto, A., Harrison, J. K., Barbieri, F. & Florio, T. CXCL12 modulation of CXCR4 and CXCR7 activity in human glioblastoma stem-like cells and regulation of the tumor microenvironment. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 1–19 (2014).
14. Saint, S., Bâtiment, E. & Fliche, A. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends Mol. Med.* **16**, 133–144 (2011).
15. Campbell, J. J. & Butcher, E. C. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 336–341 (2000).
16. Belperio, J. a *et al.* CXC chemokines in angiogenesis that regulate angiogenesis , including the CXC che-. *J. Leukoc. Biol.* **68**, 1–8 (2000).
17. Hattermann, K. *et al.* The Chemokine Receptor CXCR7 Is Highly Expressed in Human Glioma Cells and Mediates Antiapoptotic Effects. *Cancer Res.* **70**, 3299–3308 (2010).
18. Vandercappellen, J., Van Damme, J. & Struyf, S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett.* **267**, 226–244 (2008).

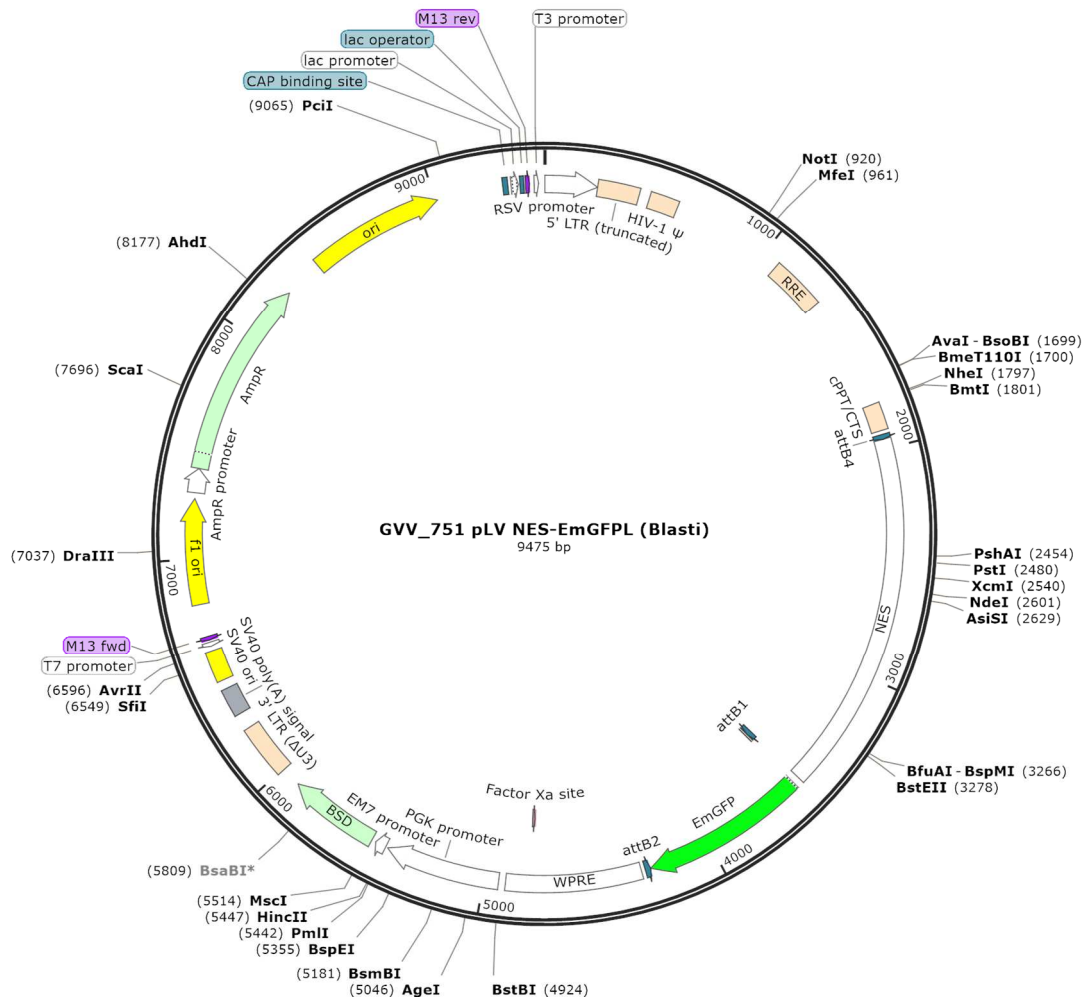
19. Shirozu, M. *et al.* Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* **28**, 495–500 (1995).
20. Sun, X., Cheng, G., Hao, M., Zheng, J. & Zhou, X. CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis and Cancer Progression. *Cancer Metastasis Rev.* **29**, 709–722 (2010).
21. Crump, M. P. Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J.* **16**, 6996–7007 (1997).
22. Furusato, B., Mohamed, A., Uhlén, M. & Rhim, J. S. CXCR4 and cancer: Review Article. *Pathol. Int.* **60**, 497–505 (2010).
23. Goffart, N. *et al.* Adult mouse subventricular zones stimulate glioblastoma stem cells specific invasion through CXCL12/CXCR4 signaling. *Neuro. Oncol.* **17**, 81–94 (2015).
24. Kofuku, Y. *et al.* Structural basis of the interaction between chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12 and its G-protein-coupled receptor CXCR4. *J. Biol. Chem.* **284**, 35240–35250 (2009).
25. Herrmann, H., Herrmann, H., Strelkov, S. V, Burkhard, P. & Aebi, U. Intermediate filaments : Primary determinants of cell architecture and plasticity Review series Intermediate filaments : primary determinants of cell architecture and plasticity. **119**, (2009).
26. Goldmann, W. H. Intermediate filaments and cellular mechanics. *Cell Biol. Int.* **42**, 132–138 (2018).
27. Neradil, J. & Veselska, R. Nestin as a marker of cancer stem cells. *Cancer Sci.* **106**, 803–811 (2015).
28. Zimmerman, L. *et al.* Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors [published erratum appears in *Neuron* 1994 Jun;12(6):following 1388]. *Neuron* **12**, 11–24 (1994).
29. Lendahl, U., Zimmerman, L. B. & McKay, R. D. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* **60**, 585–595 (1990).
30. Dahlstrand, J., Collins, V. P. & Lendahl, U. Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors. *Cancer Res.* **52**, 5334–41 (1992).
31. Lothian, C. & Lendahl, U. An evolutionarily conserved region in the second intron of the human nestin gene directs gene expression to CNS progenitor cells and to early neural crest cells. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 452–462 (1997).
32. Kawaguchi, a *et al.* Nestin-EGFP transgenic mice: visualization of the self-renewal and multipotency of CNS stem cells. *Mol. Cell. Neurosci.* **17**, 259–73 (2001).
33. Lothian, C., Prakash, N., Lendahl, U. & Wahlström, G. M. Identification of both general and region-specific embryonic CNS enhancer elements in the nestin promoter. *Exp. Cell Res.* **248**, 509–519 (1999).
34. Roy, N. S. *et al.* Promoter-targeted selection and isolation of neural progenitor cells from the adult human ventricular zone. *J. Neurosci. Res.* **59**, 321–31 (2000).
35. Kambara, H., Okano, H., Chiocca, E. A. & Saeki, Y. An oncolytic HSV-1 mutant expressing ICP34.5 under control of a nestin promoter increases survival of animals

- even when symptomatic from a brain tumor. *Cancer Res.* **65**, 2832–2839 (2005).
36. Szelechowski, M. & Saïb, A. Une nouvelle arme contre le cancer: Bilan sur les virus oncolytiques. *Virologie* **9**, 261–271 (2005).
 37. Lawler, S. E., Speranza, M.-C., Cho, C.-F. & Chiocca, E. A. Oncolytic Viruses in Cancer Treatment. *JAMA Oncol.* **3**, 841 (2017).
 38. Jahan, N., Lee, J. M., Shah, K. & Wakimoto, H. Therapeutic targeting of chemoresistant and recurrent glioblastoma stem cells with a proapoptotic variant of oncolytic herpes simplex virus. *Int. J. Cancer* **141**, 1671–1681 (2017).
 39. Nakashima, H. & Chiocca, E. A. Modification of HSV-1 to an oncolytic virus. in *Herpes Simplex Virus: Methods and protocols* (2014).
 40. Smith, K. D. *et al.* Activated MEK Suppresses Activation of PKR and Enables Efficient Replication and In Vivo Oncolysis by 134.5 Mutants of Herpes Simplex Virus 1. *J. Virol.* **80**, 1110–1120 (2006).
 41. Aghi, M., Visted, T., DePinho, R. A. & Chiocca, E. A. Oncolytic herpes virus with defective ICP6 specifically replicates in quiescent cells with homozygous genetic mutations in p16. *Oncogene* **27**, 4249–4254 (2008).
 42. Shah, K., Tang, Y., Breakefield, X. & Weissleder, R. Real-time imaging of TRAIL-induced apoptosis of glioma tumors in vivo. *Oncogene* **22**, 6865–6872 (2003).
 43. Wohlfahrt, M. E., Beard, B. C., Lieber, A. & Kiem, H. P. A capsid-modified, conditionally replicating oncolytic adenovirus vector expressing TRAIL leads to enhanced cancer cell killing in human glioblastoma models. *Cancer Res.* **67**, 8783–8790 (2007).
 44. Wu, X. & Hui, K. M. Induction of potent TRAIL-mediated tumoricidal activity by hFlex/furin/TRAIL recombinant DNA construct]. *Mol. Ther.* **9**, 674–681 (2004).
 45. Kukhanova, M. K., Korovina, a N. & Kochetkov, S. N. Human Herpes Simplex Virus: Life Cycle and Development of Inhibitors. *Biochemistry-Moscow* **79**, 1635–1652 (2014).
 46. Koyuncu, O. O., Macgibeny, M. A. & Enquist, L. W. Latent versus productive infection : the alpha herpesvirus switch. **13**, 431–443 (2018).
 47. Grünewald, K. *et al.* Three-Dimensional Structure of Herpes Simplex Virus from Cryo – Electron Tomography. *Science (80-)*. **302**, 1396–1398 (2003).
 48. Peters, C. & Rabkin, S. D. Designing herpes viruses as oncolytics. *Molecular Ther.* **2**, 1–14 (2015).
 49. Ning, J. & Wakimoto, H. Oncolytic herpes simplex virus-based strategies: Toward a breakthrough in glioblastoma therapy. *Front. Microbiol.* **5**, 1–13 (2014).
 50. Campadelli-Fiume, G., Menotti, L., Avitabile, E. & Gianni, T. Viral and cellular contributions to herpes simplex virus entry into the cell. *Curr. Opin. Virol.* **2**, 28–36 (2012).
 51. Gianni, T., Amasio, M. & Campadelli-Fiume, G. Herpes simplex virus gD forms distinct complexes with fusion executors gB and gH/gL in part through the C-terminal profusion domain. *J. Biol. Chem.* **284**, 17370–17382 (2009).
 52. Mettenleiter, T. C. Herpesvirus Assembly and Egress. *J. Virol.* **76**, 1537–1547 (2002).

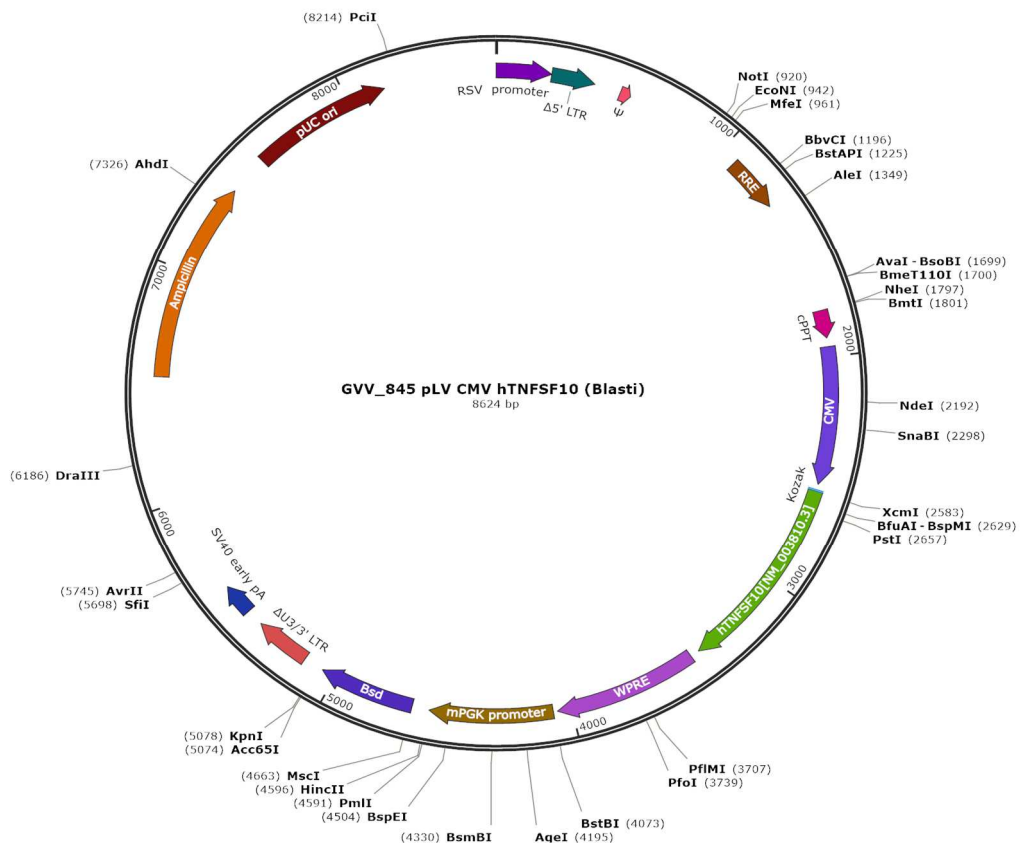
53. Smiley, J. R. Herpes simplex virus virion host shutoff protein: immune evasion mediated by a viral RNase? *J. Virol.* **78**, 1063–1068 (2004).
54. Mossman, K. L., Sherburne, R., Lavery, C., Duncan, J. & Smiley, J. R. Evidence that herpes simplex virus VP16 is required for viral egress downstream of the initial envelopment event. *J Virol* **74**, 6287–6299 (2000).
55. Pesola, J. M., Zhu, J., Knipe, D. M., Donald, M. & Coen, D. M. Herpes Simplex Virus 1 Immediate-Early and Early Gene Expression during Reactivation from Latency under Conditions That Prevent Infectious Virus Production Herpes Simplex Virus 1 Immediate-Early and Early Gene Expression during Reactivation from Latency u. **79**, 14516–14525 (2005).
56. Skaliter, R. & Lehman, I. R. Rolling circle DNA replication in vitro by a complex of herpes simplex virus type 1-encoded enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 10665–10669 (1994).
57. Sandbaumhüter, M. *et al.* Cytosolic herpes simplex virus capsids not only require binding inner tegument protein pUL36 but also pUL37 for active transport prior to secondary envelopment. *Cell. Microbiol.* **15**, 248–269 (2013).
58. Thorburn, A. Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) Pathway Signaling. *J. Thorac. Oncol.* **2**, 461–465 (2007).
59. Malley, B. W. O. No Title.
60. Hymowitz, S. G. *et al.* A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry* **39**, 633–640 (2000).
61. Bodmer, J. L., Meier, P., Tschopp, J. & Schneider, P. Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* **275**, 20632–20637 (2000).
62. Kock, N., Kasmieh, R., Weissleder, R. & Shah, K. Tumor Therapy Mediated by Lentiviral Expression of shBcl-2 and S-TRAIL. *Neoplasia* **9**, 435–442 (2007).
63. Wang, S. & El-Deiry, W. S. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* **22**, 8628–8633 (2003).
64. Emery, J. G. *et al.* Osteoprotegerin Is a Receptor for the Cytotoxic Ligand TRAIL.pdf. **273**, 14363–14367 (1998).
65. Kuijlen, J. M. A., Bremer, E., Mooij, J. J. A., Den Dunnen, W. F. A. & Helfrich, W. Review: On TRAIL for malignant glioma therapy? *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **36**, 168–182 (2010).
66. Pan, G. *et al.* An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science (80-.)*. **277**, 815–818 (1997).
67. Wu, G. S. *et al.* KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat. Genet.* **17**, 141–143 (1997).
68. Kuijlen, J. M. A. *et al.* TRAIL-receptor expression is an independent prognostic factor for survival in patients with a primary glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.* **78**, 161–171 (2006).
69. Degli-Esposti, M. *a et al.* The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet remains an incomplete death

- domain. *Immunity* **7**, 813–820 (1997).
70. Ashkenazi, A. Targeting the extrinsic apoptotic pathway in cancer : lessons learned and future directions. **125**, 487–489 (2015).
 71. Jeong, E. *et al.* The Solution Structure of FADD Death Domain. **274**, 16337–16342 (1999).
 72. Warming, S., Costantino, N., Court, D. L., Jenkins, N. A. & Copeland, N. G. Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic Acids Res.* **33**, e36 (2005).
 73. He, B. & Soderlund, D. M. Human Embryonic Kidney (HEK293) Cells Express Endogenous Voltage-Gated Sodium Currents and Nav 1.7 Sodium Channels. *Neurosci. Lett.* **469**, (2011).
 74. Wagner, N. Intermediate filament protein nestin is expressed in developing kidney and heart and might be regulated by the Wilms' tumor suppressor Wt1. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* **291**, R779–R787 (2006).
 75. Shaw, G., Morse, S., Ararat, M. & Graham, F. L. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *Faseb J* **16**, 869–871 (2002).
 76. Harper, N., Farrow, S. N., Kaptein, A., Cohen, G. M. & MacFarlane, M. Modulation of Tumor Necrosis Factor Apoptosis-inducing Ligand-induced NF- κ B Activation by Inhibition of Apical Caspases. *J. Biol. Chem.* **276**, 34743–34752 (2001).
 77. Tamura, K. *et al.* Multimechanistic tumor targeted oncolytic virus overcomes resistance in brain tumors. *Mol. Ther.* **21**, 68–77 (2013).

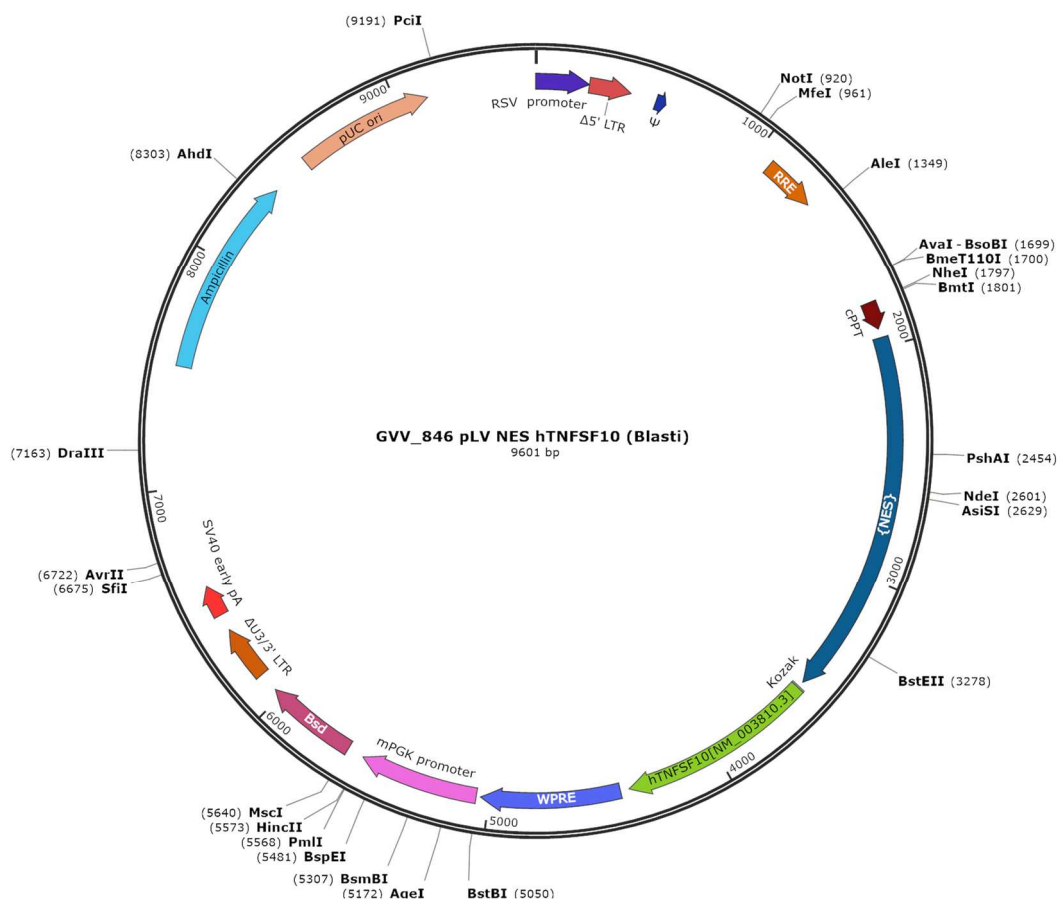
Annexes



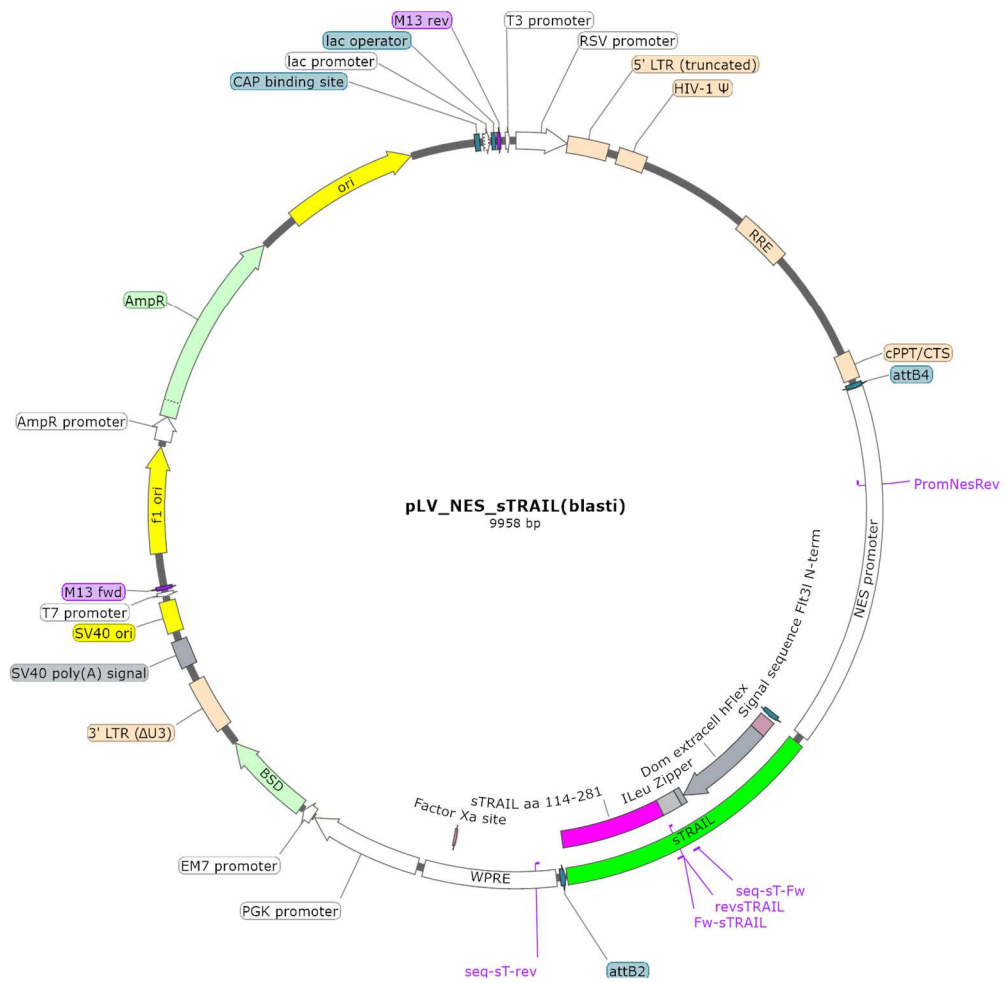
Annexe 1 : Carte du plasmide lentiviral pLV_pNES_GFP.



Annexe 2 : Carte du plasmide lentiviral pLV_pCMV_TRAIL.



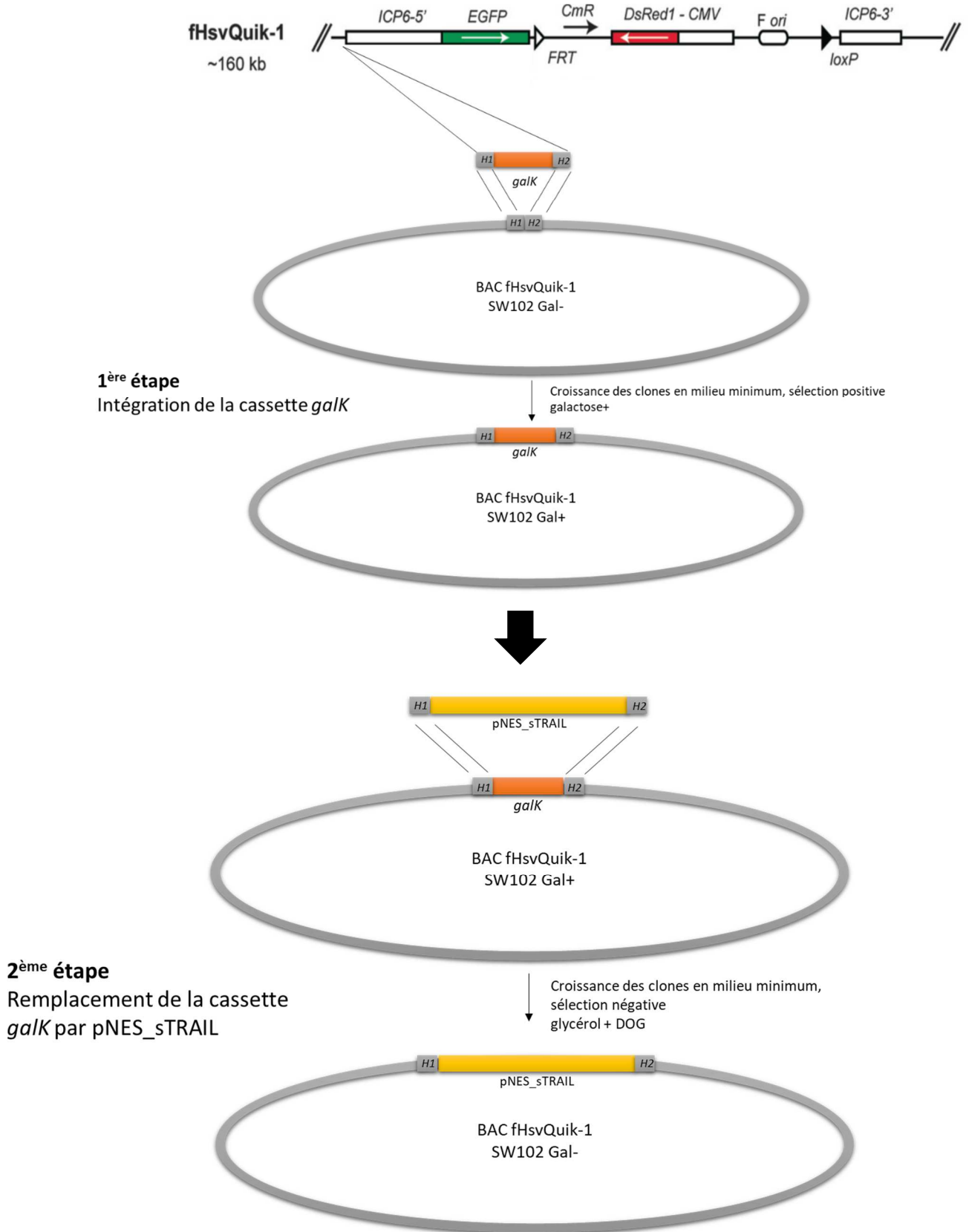
Annexe 3 : Carte du plasmide lentiviral pLV_pNES_TRAIL.



Annexe 4 : Carte du plasmide lentiviral pLV_pNES_sTRAIL.

	10	20	30	40	50
MAMMEVQGGP	SLGQTCVLIV	IFTVLLQSLC	VAVTYVYFTN	ELKQMQDKYS	
	60	70	80	90	100
KSGIACFLKE	DDSYWDPNDE	ESMNSPCWQV	KWQLRQLVRK	MILRTSEETI	
	110	120	130	140	150
STVQEKQQNI	SPLVREERGPO	RVAAHITGTR	GRSNTLSSPN	SKNEKALGRK	
	160	170	180	190	200
INSWESSRSG	HSFLSNLHLR	NGELVIHEKG	FYYIYSQTYF	RFQEEIKENT	
	210	220	230	240	250
KNDKQMVQYI	YKYTSYPDPI	LLMKSARNSC	WSKDAEYGLY	SIYQGGIFEL	
	260	270	280		
KENDRIFVSV	TNEHLIDMDH	EASFFGAFLV	G		

Annexe 5 : Séquence peptidique de TRAIL.



Annexe 6 : Schéma de la stratégie mise en place pour l'intégration de la cassette pNES_sTRAIL dans le bacmide fHSVQuik-1. Adapté de Warming et al.⁷² et de Nakasima et al.³⁹

Preuve de principe de l'utilisation de virus HSV oncolytique « ciblé » et « armé » pour induire l'apoptose de manière ciblée dans des glioblastomes.

Le glioblastome multiforme est la forme la plus agressive et la plus répandue des tumeurs gliales. La gravité de ce cancer est définie par sa propagation très rapide, son haut taux de récurrence, sa capacité de migration vers la zone sous-ventriculaire et le très mauvais pronostic associé. Malgré les thérapies actuelles, les patients atteints de GBM présentent une survie en général de 12 à 15 mois en raison des récurrences particulièrement fréquentes. Il est donc primordial de développer de nouvelles méthodes thérapeutiques qui permettront non seulement de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses mais également d'empêcher toute rechute due aux cellules souches tumorales qui peuvent échapper à la résection. Un nouvel espoir dans la lutte contre ce cancer est l'utilisation de virus atténués, dont fait partie oHSV.

L'objectif de cette étude est de générer un Herpès virus oncolytique ciblé et armé, dont l'injection directe dans la zone tumorale *in vivo* permettra la reconnaissance spécifique des cellules tumorales et l'induction de leur mort.

Dans ce travail, nous avons généré une cassette pNES_sTRAIL qui permet l'expression d'une forme soluble de la protéine TRAIL sous le contrôle d'un promoteur nestine, un promoteur activé dans les cellules souches du glioblastome. Grâce à l'utilisation de vecteurs lentiviraux, nous avons démontré l'expression de la protéine sTRAIL dans le cytoplasme de cellules transfectées et transduites, indiquant que le promoteur nestine est bien actif dans les cellules issues de glioblastome. Suite à cela, nous avons prouvé que la protéine sTRAIL induit l'apoptose des cellules issues de lignées cancéreuses gliales transduites avec le virus encodant la cassette pNES_sTRAIL et n'a aucun effet dans les cellules dans lesquelles le promoteur nestine est inactif, confirmant l'efficacité de la construction.

Ces différentes observations confirment la spécificité du promoteur et l'efficacité de la protéine de fusion dans l'induction de l'apoptose. Ces résultats prometteurs offrent beaucoup d'espoir pour la construction d'un oHSV oncolytique.

Ce mémoire a été réalisé par COLLIGNON Alice durant l'année académique 2017-2018 au sein du laboratoire de virologie et d'immunologie du GIGA ULiège sous la supervision du Professeur Catherine Sadzot-Delvaux et de Judit Sanchez.

