

Université de Sherbrooke

Caractérisation de la réponse immunitaire au virus de la stomatite vésiculaire oncolytique dans le cancer de la vessie

Par Francis Bernier-Godon
Programme d'immunologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du grade de maître en sciences (MSc) en Immunologie

Sherbrooke, Québec, Canada; Juin, 2019

Membres du jury d'évaluation :

Directrice de recherche Lee-Hwa Tai, PhD, Département d'anatomie et de biologie cellulaire
Co-directeur de recherche Patrick Richard, MD, Département de chirurgie
Évaluatrice interne Claire Dubois, PhD, Département d'anatomie et de biologie cellulaire
Évaluatrice externe Marie-Josée Boucher, PhD, Département de médecine

Résumé

Le cancer de la vessie est le cinquième cancer le plus fréquent au Canada avec plus de 9 000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année. Les cancers de la vessie non-invasifs sont plus fréquents que ceux du sous-type invasif, mais ces cancers ont tendance à récidiver et à évoluer vers des cancers de la vessie invasifs. Pour diminuer ce risque, le Bacille de Calmette-Guérin (BCG) intravésical est administré de façon postopératoire aux patients à haut risque. Cependant, cette immunothérapie est associée à des effets indésirables importants. Par conséquent, il est important d'identifier des traitements alternatifs pour diminuer le risque de récurrence et de progression chez les patients chez lesquels un risque élevé de cancer de la vessie non invasif (NMIBC *Non-Muscle Invasive Bladder Cancer*) a été diagnostiqué. Une des stratégies de traitement prometteuse est l'utilisation de virus oncolytiques (VO) intravésicaux. Ces virus sont spécifiques aux cellules tumorales puisque les voies antivirales compromises sont très fréquentes chez ces dernières. Donc, la propagation du virus se fait surtout au niveau du micro-environnement tumoral. De surcroît, les VO induisent aussi une réponse immunitaire. La combinaison de la réplication localisée et de l'activation immunitaire ciblée subséquente en fait de bons candidats en tant qu'agents thérapeutiques pour le cancer de la vessie. Dans ce projet, nous évaluons l'impact de deux virus recombinants de la stomatite vésiculaire ou VSV (VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF) sur le développement du cancer de la vessie. Nous émettons l'hypothèse que l'infection des cellules cancéreuses humaines de la vessie avec le VSV δ 51 et l'infection des cellules cancéreuses murines de la vessie avec le VSV δ 51 et le VSV δ 51-GM-CSF induira une mort cellulaire immunogène de ces cellules. Nous émettons aussi l'hypothèse que l'injection intravésicale du VSV δ 51 et du VSV δ 51-GM-CSF dans un modèle de souris syngénique cliniquement pertinent de cancer de la vessie activera de façon importante les réponses immunitaires innées et adaptatives dirigées contre les tumeurs et que le traitement au VSV δ 51-GM-CSF offrira un degré de réponse plus élevé. Pour atteindre les objectifs de cette étude, nous avons utilisé les lignées cellulaires humaines UMUC3 et 5637 ainsi que la lignée cellulaire murine de cancer de la vessie MB49 dans des études *in vitro* et *in vivo*. Les cellules infectées et leurs surnageants ont été récoltés pour déterminer la nature de la mort cellulaire induite par le virus. La réponse immunitaire fonctionnelle des cellules humaines a été monitorée dans des essais *in vitro* alors que celle des cellules murines a été testée dans un modèle de souris syngéniques. En utilisant la cytométrie en flux multicolore, l'immunobuvardage, la microscopie électronique et les tests immunologiques, nous avons observé la présence de motifs moléculaires associés aux dommages (DAMPs) suite à une infection des lignées humaines et murines. Ces molécules sont associées à une mort cellulaire immunogénique. Des tests *in vitro* ont démontré que les monocytes et les populations de lymphocytes sont activés par les molécules relâchées par les cellules humaines infectées. Des études des effets *in vivo* de VSV δ 51 dans un modèle syngénique et orthotopique de cancer de la vessie impliquant les souris C57Bl/6 et la lignée MB49 ont été effectués. Sur le plan de l'immunité innée, les essais *in vivo* ont démontré que les virus ont un effet activateur chez les cellules NK et induisent la maturation des cellules dendritiques. Sur le plan de l'immunité adaptative, le traitement avec le VSV δ 51 a induit l'activation des cellules effectrices T CD8⁺. Une déplétion pharmacologique des cellules effectrices a permis de valider l'importance de ces populations dans le cadre du traitement avec le VSV δ 51. En effet, les souris immunocompétentes avaient le meilleur pronostic. Ces études translationnelles démontrent le potentiel du VSV δ 51 pour le traitement du cancer de la vessie et l'amélioration potentielle du pronostic des patients atteints du NMIBC.

Mots-clés : Cancer de la vessie non-invasif sur le plan musculaire (NMIBC), Virus oncolytique (VO), Motifs moléculaires associés aux dommages (DAMPs)

Table des matières

Résumé	II
Liste des figures	VII
Liste des abréviations	IX
Rationnelle pour l'étude sur le virus oncolytique VSV δ 51 pour le traitement du cancer de la vessie non-invasif	- 1 -
1. Introduction	- 2 -
1.1 <i>Cancer de la vessie</i>	- 2 -
1.1.1 Anatomie de la vessie	- 2 -
1.1.2 Épidémiologie	- 2 -
1.1.3 Facteurs de risque	- 3 -
1.1.4 Diagnostic du cancer de la vessie	- 3 -
1.1.5 Pathologie du cancer de la vessie	- 4 -
1.1.6 <i>Traitements actuels pour le cancer de la vessie Non-invasif</i>	- 5 -
1.1.7 <i>Traitements cancers de la vessie envahissant le muscle</i>	- 6 -
1.2 <i>Limitations des traitements adjuvants pour le cancer de la vessie non-invasif</i>	- 7 -
1.3 <i>Surveillance immunitaire du cancer</i>	- 8 -
1.4 <i>Mécanismes d'évasion tumoraux du système immunitaire</i>	- 10 -
1.6 <i>Immunothérapies pour le cancer de la vessie</i>	- 12 -
1.6.1 Introduction du BCG	- 12 -
1.6.3 Limites du traitement BCG	- 16 -
1.7 <i>Virus Oncolytiques (VO)</i>	- 18 -
1.8 <i>Mise en contexte de VSVδ51</i>	- 19 -
1.9 <i>Mécanismes d'action de VSVδ51</i>	- 22 -
1.10 <i>Utilisation de VSVδ51 et VSVδ51-GM-CSF en immunothérapie</i>	- 24 -
1.11 <i>Mort cellulaire immunogénique</i>	- 26 -
2. Rationalisation du projet	- 29 -
2.1 <i>Hypothèses</i>	- 30 -
2.2 <i>Buts spécifiques</i>	- 30 -
3. Matériels et méthodes	- 31 -
3.1 <i>Culture Cellulaire</i>	- 31 -
3.2 <i>Production de VSVδ51 et VSVδ51-GM-CSF</i>	- 31 -

<i>3.3 Titrage des virus VSVδ51 et VSVδ51-GM-CSF</i>	- 32 -
<i>3.4 Essais de viabilité cellulaire au sel de tétrazolium (essai MTT)</i>	- 32 -
<i>3.5 Caractérisation de la mort cellulaire</i>	- 33 -
<i>3.6 Microscopie à fluorescence sur les cultures cellulaires infectées par le VSVδ51:</i>	- 33 -
<i>3.7 Microscopie électronique sur les cultures cellulaires infectées par le VSVδ51:</i>	- 34 -
<i>3.8 Immunobuvardage pour détecter High Mobility Group Box 1 (HMGB-1)</i>	- 34 -
<i>3.9 Caractérisation de l'ATP dans les surnageants après infection des cellules</i>	- 35 -
<i>3.10 Caractérisation de la migration des cellules effectrices humaines</i>	- 35 -
<i>3.11 Caractérisation de la polarisation des monocytes humains</i>	- 36 -
<i>3.12 Caractérisation des ARNm</i>	- 37 -
<i>3.14 Caractérisation par ELISA des protéines relâchées par les cellules tumorales murines infectées</i>	- 38 -
<i>3.15 Modèles syngéniques orthotopiques de cancer de la vessie</i>	- 39 -
<i>3.16 Établissement des tumeurs de la vessie orthotopique du modèle murin</i>	- 40 -
<i>3.17 Traitement intravésical avec VSVδ51 et VSVδ51-GM-CSF</i>	- 41 -
<i>3.18 Implantation et visualisation des tumeurs de la vessie en modèle murin par échographie</i>	- 41 -
<i>3.19 Prélèvement sanguin des souris</i>	- 42 -
<i>3.20 Dissociation de la rate souris en une suspension cellulaire</i>	- 42 -
<i>3.21 Dissociation de la vessie en une suspension cellulaire</i>	- 43 -
<i>3.22 Stimulation avec PMA/Ionomycine pour la cytométrie de flux</i>	- 43 -
<i>3.23 Déplétion pharmacologique des cellules effectrices</i>	- 45 -
4. Résultats	- 46 -
<i>4.1 Caractérisation de la mort cellulaire induite par les virus VSVδ51 sur les lignées cellulaires humaines de cancer de la vessie et VSVδ51 et VSVδ51-GM-CSF sur la lignée cellulaire murine de cancer de la vessie.</i>	- 46 -
4.1.1 Susceptibilité des lignées cellulaires humaines du cancer de la vessie à l'infection par VSVδ51 et de la lignée murine de cancer de la vessie avec VSVδ51 et VSVδ51-GM-CSF.	- 46 -
-	
4.1.2 Caractérisation de l'effet cytotoxique de VSVδ51 sur les lignées cellulaires humaines.	- 50 -
4.1.3 Caractérisation de la mort cellulaire induite par les virus par VSVδ51 dans les lignées humaines du cancer de la vessie UMUC3 et 5637 et par VSVδ51 et VSVδ51-GM-CSF dans la lignée murine du cancer MB49.	- 51 -
4.1.4 Caractérisation du relâchement de HMGB1 après infection par VSVδ51 dans les lignées humaines du cancer de la vessie UMUC3 et 5637 et par VSVδ51 et VSVδ51-GM-CSF dans la lignée murine du cancer de la vessie MB49.	- 55 -

4.1.5	Caractérisation du relâchement d'ATP après infection des lignées cellulaires humaines de cancer de la vessie UMUC3 et 5637 par VSVδ51	- 57 -
4.2	<i>Caractérisation des effets des molécules relâchées sur les cellules immunitaires humaines.</i>	- 59 -
	-	
4.2.1	Caractérisation des propriétés activatrices des molécules relâchées sur les monocytes humains.	- 59 -
4.2.2	Caractérisation des propriétés attractantes des molécules relâchées sur les lymphocytes effecteurs humains.	- 61 -
4.3	<i>Caractérisation des ARNm exprimés par les cellules murines de cancer de la vessie suite à une infection par les virus VSVδ51 et VSVδ51-GM-CSF.</i>	- 64 -
4.4	<i>Caractérisation par ELISA des protéines exprimées par les cellules murines de cancer de la vessie à la suite d'une infection par les virus VSVδ51 et VSVδ51 GM-CSF.</i>	- 67 -
4.5	<i>Caractérisation in vivo en modèle syngénique des effets du traitement avec VSVδ51 et VSVδ51- GM-CSF sur les cellules immunitaires.</i>	- 69 -
4.6	<i>Caractérisation de l'implication des cellules immunitaires effectrices dans le fonctionnement du traitement avec le virus oncolytique VSVδ51.</i>	- 75 -
5.	Discussion	- 78 -
5.1	<i>Caractérisation de la mort cellulaire induite par les virus VSVδ51 chez les lignées cellulaires humaines de cancer de la vessie et des virus VSVδ51 et VSVδ51-GM-CSF sur la lignée cellulaire murines de cancer de la vessie.</i>	- 78 -
5.2	<i>Caractérisation de la mort cellulaire induite par les virus par VSVδ51 dans les lignées humaines de cancer de la vessie UMUC3 et 5637 et par VSVδ51 et VSVδ51-GM-CSF dans la lignée murine de cancer de la vessie MB49.</i>	- 82 -
5.3	<i>Caractérisation de DAMPs relâchés post infection les lignées cellulaires de cancer de la vessie UMUC3, 5637 et MB49 par les VO VSVδ51 et VSVδ51-GM-CSF.</i>	- 83 -
5.4	<i>Caractérisation de la polarisation des monocytes humains après exposition aux surnageants provenant de cultures infectées par les virus oncolytiques.</i>	- 86 -
5.5	<i>Quantification de la migration des cellules immunitaires effectrices humaines.</i>	- 88 -
5.6	<i>Caractérisation des ARNm induits par l'infection de cellules murines de cancer de la vessie par les virus VSVδ51 et VSVδ51-GM-CSF.</i>	- 89 -
5.7	<i>Caractérisation des protéines induites par l'infection de cellules murines de cancer de la vessie murine par les virus VSVδ51 et VSVδ51-GM-CSF</i>	- 92 -
5.8	<i>Caractérisation in vivo des effets du traitement avec VSVδ51 et VSVδ51-GM-CSF sur les cellules immunitaires dans un modèle syngénique murin de cancer de la vessie.</i>	- 93 -
5.9	<i>Caractérisation de l'implication des cellules immunitaires effectrices dans le traitement avec le virus oncolytique VSVδ51.</i>	- 98 -
6.	Conclusions et perspectives	- 99 -

Liste des figures

Figure 1 : Présentation des stades de cancer de la vessie.....	5 -
Figure 2 : Motifs d'arrêt du régime de traitement BCG au cours de la première année.....	8 -
Figure 3 : Mécanisme d'action de BCG au niveau des cellules cancéreuses	16 -
Figure 4: Mécanisme d'action de BCG au niveau des cellules immunitaires	16 -
Figure 5 : Représentation du virus recombinant VSV δ 51	21 -
Figure 6 : Mécanismes d'action général des virus oncolytiques	24 -
Figure 7 : Marqueurs généraux d'une mort cellulaire immunogénique.....	28 -
Figure 8 : Détermination de l'expression du transgène viral et de la mort cellulaire chez la lignée cellulaire humaine de cancer de la vessie UMUC3	48 -
Figure 9 : Détermination de l'expression du transgène viral et de la mort cellulaire chez la lignée cellulaire humaine de cancer de la vessie 5637	49 -
Figure 10 : Détermination de l'expression du transgène viral et de la mort cellulaire chez la lignée cellulaire murine de cancer de la vessie MB49.....	50 -
Figure 11 : Caractérisation des effets VSV δ 51 sur la viabilité des lignées cellulaires humaines ..	51 -
Figure 12 : Caractérisation par cytométrie en flux de la mort cellulaire induite par VSV δ 51 chez les UMUC3	53 -
Figure 13 : Caractérisation par cytométrie en flux de la mort cellulaire induite par VSV δ 51 chez les 5637	53 -
Figure 14 : Caractérisation par cytométrie en flux de la mort cellulaire induite par VSV δ 51 chez les MB49.....	54 -
Figure 15 : Caractérisation par cytométrie en flux de la mort cellulaire induite par VSV δ 51 GM-CSF chez les MB49.....	55 -
Figure 16 : Caractérisation de la présence du DAMP HMGB1 suite à une infection par VSV δ 51 dans les lignées cellulaires humaines UMUC3 et 5637	56 -
Figure 17 : Caractérisation de la présence du DAMP HMGB1 suite à une infection par VSV δ 51 et VSV δ 51 GM-CSF dans la lignée murine de cancer de la vessie	57 -
Figure 18 : Caractérisation de la présence d'ATP relâché suite à une infection par VSV δ 51 des cellules humaines de cancer de la vessie	58 -
Figure 19 : Caractérisation de la différenciation des monocytes suite à une incubation de 24h avec du surnageant provenant de cellules humaines de cancer de la vessie infectées.....	60 -
Figure 20 : Caractérisation de la différenciation des monocytes suite à une incubation de 24h avec du surnageant provenant de cellules humaines de cancer de la vessie infectées.....	61 -
Figure 21 : Quantification des cellules effectrices migrantes après incubation avec le surnageant de cellules UMUC3 infectées	63 -
Figure 22 : Quantification des cellules effectrices migrantes après incubation avec le surnageant de cellules 5637 infectées	64 -
Figure 23 : Caractérisation de l'expression des molécules impliquées dans la présentation d'antigènes après infection de cellules MB49 pour une durée de 15h par VSV δ 51 et VSV δ 51 GM-CSF.....	66 -
Figure 24 : Caractérisation de l'expression des molécules impliquées dans la présentation d'antigènes après infection de MB49 pour une durée de 15h par VSV δ 51 et VSV δ 51 GM-CSF .	67 -

Figure 25 : Quantification de chimiokines exprimées après infection avec VSV δ 51 et VSV δ 51 GM-CSF	- 68 -
Figure 26 : Quantification du facteur de croissance GM-CSF exprimé après infection avec VSV δ 51 et VSV δ 51 GM-CSF	- 69 -
Figure 27 : Profil d'activation des cellules NK au niveau systémique suite aux traitements avec les virus oncolytiques VSV δ 51 et VSV δ 51 GM-CSF	- 72 -
Figure 28 : Profil de maturation des cellules dendritiques conventionnelles au niveau systémique suite aux traitements avec les virus oncolytiques VSV δ 51 et VSV δ 51 GM-CSF	- 73 -
Figure 29 : Profil d'activation des cellules NK au niveau systémique suite aux traitements avec les virus oncolytiques VSV δ 51 et VSV δ 51 GM-CSF	- 73 -
Figure 30 : Profil d'activation des lymphocyte T CD8+ au niveau systémique suite aux traitements avec les virus oncolytiques VSV δ 51 et VSV δ 51 GM-CSF	- 74 -
Figure 31 : Profil d'activation des lymphocyte T CD8+ et des cellules NK infiltrantes suite aux traitements avec les virus oncolytiques VSV δ 51 et VSV δ 51 GM-CSF	- 75 -
Figure 32 : Caractérisation de l'implication des cellules immunitaires effectrices dans le fonctionnement du traitement avec le virus oncolytique VSV δ 51	- 77 -

Liste des abréviations

4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)
Adénosine triphosphate (ATP)
Bacille de Calmette-Guérin (BCG)
Cancer de la vessie non invasif (NMIBC *Non-Muscle Invasive Bladder Cancer*)
Cancer de la vessie invasif (MIBC *Muscle Invasive Bladder Cancer*)
Complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMHII)
Cellules myéloïdes suppressives (MDSCs)
Cellules T régulatrices (Tregs)
Cellules présentatrices d'antigènes (APCs *Antigen Presenting Cells*)
Dérivée d'une xéno greffe de patient (PDX *Patient Derived Xenograft*)
Dulbecco modified culture medium (DMEM)
Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)
Facteur de nécrose tumorale (TNF α *Tumor Necrosis Factor*)
Facteur de croissance transformant (TGF β *Transforming growth factor β*)
Facteur de croissance transformant (TGF β *Transforming growth factor β*)
Interférons γ (IFN γ)
Immunoabsorption par enzyme liée (ELISA)
Intraveineuse (IV)
Interférons (IFNs)
Lymphocytes infiltrants les tumeurs (TILs)
La nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P), la protéine matrice (M), la glycoprotéine (G) et la polymérase large (L)
Lipopolysaccharides (LPS)
Motifs moléculaires associés aux dommages (DAMPs)
Motifs de reconnaissance moléculaires (PRRs *Pattern Recognition Receptors*)
Molécule attractante de monocytes (MCP-1 *Monocyte chemoattractant protein 1*)
Motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs)
NCG (NOD Crispr Prkdc gamma)
Protéine inflammatoire macrophagique 1b (MIP-1b)
Protéine IP-10, le
Paraméthoxyamphétamin (PMA)
Protéine fluorescente verte (GFP *Green Fluorescent Protein*)
Récepteurs de type toll (TLRs)
Roswell Park Memorial Institute (RPMI)
Sel de tétrazolium (MTT)
TNM (T pour tumeur primitive, N pour Nodes lymphatiques et M pour Métastases)
Transporteurs associés aux complexes protéiques (TAP *Transporter associated with antigen processing*)
Tampon phosphate salin (PBS *Phosphate Buffered Saline*)
Unité formant des plaques (PFU)

Rationnelle pour l'étude sur le virus oncolytique VSV δ 51 pour le traitement du cancer de la vessie non-invasif

Avec plus de 9000 nouveaux cas par année, le cancer de la vessie est le cinquième cancer le plus fréquent au Canada. Il est également le cancer engendrant le plus important coût par traitement pour l'état.¹ Parmi ces nouveaux cas, la majorité sont de type non-invasif. Les traitements actuels du cancer de la vessie non-invasif comprennent la résection transurétrale et l'administration intravésicale de traitements adjuvants soit sous forme de chimiothérapie ou d'immunothérapie (Bacillus Calmette-Guérin (BCG)). Cependant, malgré les traitements offerts, la maladie va récidiver dans 60 à 80% des cas^{1,2}. De plus, les traitements actuels sont souvent mal tolérés par les patients et ainsi, plusieurs doivent cesser le traitement de façon prématurée³. Par conséquent, une thérapie adjuvante pouvant aider à potentialiser la résection transurétrale et prévenir les cas de récurrence s'avère à être nécessaire. Alors, l'alternative offerte dans le cadre de cette étude sont les virus oncolytiques VSV δ 51 qui possèdent des propriétés immunothérapeutiques similaires au BCG mais avec une fenêtre thérapeutique plus compréhensive.

1. Introduction

1.1 Cancer de la vessie

1.1.1 Anatomie de la vessie

La structure anatomique de la vessie peut se décrire par trois couches cellulaires concentriques superposées. La première couche est composée de cellules épithéliales hautement spécialisées, formant l'urothélium⁴. Cette structure comprend trois types principaux de cellules qui sont les cellules basales, les cellules intermédiaires et les cellules superficielles⁴. L'urothélium est lui-même entouré par une seconde couche composée de tissus conjonctifs, de vaisseaux sanguins et des glandes. Cette couche intermédiaire est la *lamina propria*. La troisième couche, nommée la couche musculuse, englobe l'organe et est composée de feuillets musculaires impliqués dans les fonctions mécaniques de la vessie surtout en ce qui concerne la rétention et l'expulsion d'urine⁴.

1.1.2 Épidémiologie

Le cancer de la vessie représente un des cancers les plus diagnostiqués au Canada. Chaque année le cancer de la vessie compte pour 6.5% des nouveaux cas de cancer chez les hommes et pour 2.1% des nouveaux cas de cancer chez les femmes⁵. En raison des nombreuses consultations avec des professionnels de la santé, des procédures médicales à suivre ainsi que du suivi des patients, les coûts s'additionnent et en font le cancer le plus coûteux à traiter dans la province du Québec⁶.

1.1.3 Facteurs de risque

Les facteurs de risque pour le développement de la maladie incluent notamment le tabac, la radiothérapie pelvienne, certaines chimiothérapies, ainsi que des facteurs de prédispositions génétiques⁷. Aussi, l'homme, ayant généralement une vessie plus volumineuse que la femme, urine moins souvent ce qui augmente le temps de contact de l'urothélium avec les différentes toxines. Or, ce temps de contact prolongé favorise la formation des cellules cancéreuses au niveau de la vessie. En outre, le tabac représente le facteur de risque le plus important et la majorité des patients atteints du cancer de la vessie sont des hommes⁷, bien que les femmes ont souvent des cancers de la vessie plus agressifs⁸. De plus, d'autres facteurs peuvent être impliqués dans la formation d'un cancer de la vessie. Par exemple, les métiers à haut risque de contact avec des cancérigènes demeurent, malgré une législation plus adéquate, un facteur de risque important⁹. De surcroît, la médication, contenant des agents mutagènes, est également considérée comme un facteur étiologique du cancer de la vessie⁹.

1.1.4 Diagnostic du cancer de la vessie

Le symptôme principal menant au diagnostic du cancer de la vessie est l'hématurie ou autrement dit, la présence de sang dans l'urine. Cependant d'autres symptômes de troubles urinaires sont caractéristiques de la pathologie tels que la difficulté à uriner (dysurie) et le besoin plus fréquent d'uriner (pollakiurie)¹⁰. Le diagnostic histologique de la maladie s'obtient par le biais d'une résection transurétrale de la tumeur. Cette méthode permet la caractérisation du stade du cancer de la vessie. La nature hétérogène du cancer de la vessie nécessite une adaptation précise dans la nature des traitements offerts suite à un diagnostic puisque des tumeurs de grades et de stades différents requièrent des traitements spécifiques pour être ciblées adéquatement¹¹.

En définitive, le cancer de la vessie est un problème de santé commun au Canada et les modalités de traitements méritent une investigation plus approfondie.

1.1.5 Pathologie du cancer de la vessie

Histologiquement, environ 90% des tumeurs de la vessie sont des carcinomes urothéliaux¹². Ceux-ci peuvent être divisés en deux grandes catégories soit les cancers de la vessie non-invasifs ou encore, les *Non-Muscle Invasive Bladder Cancer* (NMIBC) et les cancers de la vessie envahissants le muscle ou encore, les *Muscle Invasive Bladder Cancer* (MIBC). Cependant cette catégorisation ne peut témoigner de l'hétérogénéité des populations tumorales. C'est pourquoi il est préférable d'employer une classification plus pointue soit la classification TNM (T pour tumeur primitive, N pour Nodes lymphatiques et M pour Métastases)². Selon cette dernière, les tumeurs limitées au niveau de la muqueuse de la vessie (aussi appelée urothélium) sont classifiées comme étant soit le stade Ta ou carcinome *in situ* (CIS)¹⁰. Au niveau du stade T1, on retrouve les tumeurs ayant infiltré la sous-muqueuse (i.e. lamina propria) de la vessie¹⁰. En outre, les groupes Ta, CIS et T1 représentent dans un cadre plus large les NMIBC. Ces mêmes tumeurs peuvent également être sous-divisées en deux catégories selon leur degré de distorsion architecturale, soit les tumeurs de bas et de haut grade. Les tumeurs dites de haut grade possèdent un potentiel de malignité et de métastase plus important que celles de bas grade². Par ailleurs, dans la grande catégorie des MIBC, les stades se divisent en T2, T3 et T4 (Figure 1). Ces stades sont conférés selon le degré d'invasion de la tumeur. Le stade T2 représente une tumeur envahissant la paroi musculaire de la vessie; le stade T3, la graisse péri-vésicale; et le stade T4, les organes adjacents (ex. le rectum, la prostate chez l'homme, l'utérus chez la femme, etc.)¹⁰.

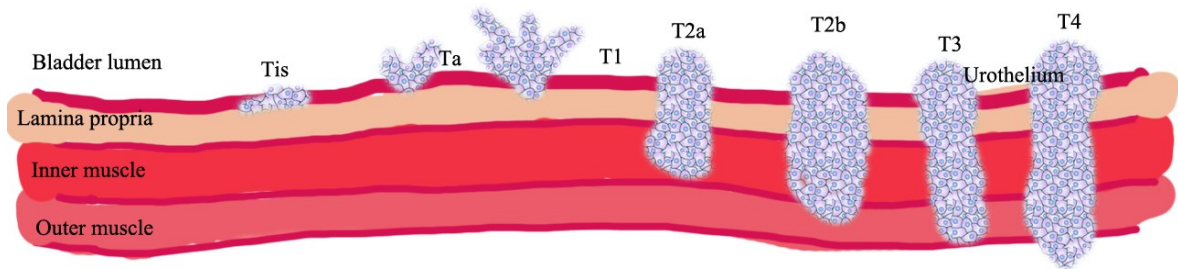


Figure 1 : Présentation des stades de cancer de la vessie. Schéma représentant les stades de cancer de la vessie allant du carcinome *in situ* ou Tis, Ta, T1 représentant les stades appartenant à la catégorie non-invasive de la maladie. Les stades T2a, T2b T3 et T4 représentent les stades invasifs où les couches musculaires internes et externes sont pénétrées par les cellules tumorales. (Figure modifiée de Knowles et al. 2015)¹³

Bien que la majorité des cas de cancer de la vessie appartient à la catégorie des NMIBC (environ 75%), la majeure partie des décès associés au cancer de la vessie est provoquée par des tumeurs de la catégorie de MIBC¹². Néanmoins, les tumeurs dites NMIBC ont une propension à la récurrence, et certaines progresseront même en MIBC. Par conséquent, l'administration de traitements adjuvants étant en mesure de prévenir leur récurrence et leur progression représente une étape clé de la prise en charge des tumeurs de type NMIBC.

1.1.6 Traitements actuels pour le cancer de la vessie Non-invasif

Actuellement, la résection transurétrale de la tumeur est le traitement de base pour tous les types de cancer NMIBC et est également utilisée pour établir le grade de tumeur¹². Cependant, comme ces tumeurs ont une propension à la récurrence, et même vers la progression dans le cas des tumeurs de type T1 de haut grade, cette résection s'accompagne aussi de traitements intravésicaux adjuvants tels que l'administration de BCG ou de chimiothérapies visant à freiner la récurrence et/ou la progression de la maladie¹¹. Le traitement adjuvant de type chimiothérapie intravésicale est recommandé dans les 24h suivant la

résection tumorale. Cette procédure contribue à prévenir la récurrence pour les tumeurs non-invasives de bas grade¹⁴. En contrepartie, l'instillation d'agents chimiothérapeutiques est à proscrire s'il y a perforation de l'urothélium lors de l'intervention chirurgicale¹⁵. D'autre part, les traitements immunothérapeutiques sont considérés comme le traitement adjuvant de choix pour les NMIBC de haut grade. Le BCG est présentement le traitement immunothérapeutique le plus efficace et est offert depuis plus de quarante ans¹⁶. Cependant pour les patients incapables de suivre le parcours de traitement requis pour le fonctionnement adéquat du BCG, des tentatives de récupérations existent¹⁷. Le parcours de traitement du BCG est d'une durée de trois ans et comprend 28 doses où les six premières sont hebdomadaires et deviennent ensuite trimestrielles pour ensuite devenir biannuelles³. Dans ces cas-là, les interférons alpha (IFN α), qui agissent directement sur la tumeur et les bloqueurs de points de contrôle immunitaire tels que des anticorps anti-PDL-1, peuvent être offerts aux patients¹⁷. Les cytokines thérapeutiques sont employées à titre de contremesure pour les mécanismes de défenses tumorales. En raison des pressions sélectives sur les cellules cancéreuses, celles-ci évoluent pour exprimer des cytokines visant à induire un phénotype tolérogénique chez les cellules immunitaires. L'utilisation de cytokines permet d'orienter les cellules immunitaires vers une réponse cytotoxique adéquate ayant pour rôle l'élimination des cellules cancéreuses¹⁸. Certes, les traitements mentionnés ou IFN α et des anticorps anti-PDL-1 s'appliquent pour les NMIBC et sont accessibles pour les patients atteints de tumeurs ne répondant pas favorablement au traitement BCG.

1.1.7 Traitements cancers de la vessie envahissant le muscle

Dans le cas des cancers de types MIBC ou autrement dit à partir du stade T2, la cystectomie ou ablation de la vessie devient la principale option de choix¹¹. Pour ces tumeurs,

il a été démontré que l'administration d'une chimiothérapie intraveineuse, soit en néoadjuvant ou en adjuvant améliore le pronostic¹¹. En résumé, l'intervention chirurgicale est indispensable pour diriger le cours du traitement et doit être complétée d'alternatives pour potentialiser son action sauf si la tumeur est à un stade trop avancé, ce qui requiert une procédure radicale.

1.2 Limitations des traitements adjuvants pour le cancer de la vessie non-invasif

Tel que mentionné, la majorité des patients avec un cancer de la vessie non-invasif reçoit des traitements adjuvants visant à contrôler la progression et/ou la récurrence de la maladie¹⁴. Malheureusement, malgré ceux-ci, la récurrence de ces cancers reste tout de même importante soit environ 80%¹⁹. Également, les traitements au BCG comportent aussi leur lot de complications. En effet, les effets secondaires induits par l'administration du BCG sont généralement au niveau local et peuvent inclure l'hématurie et les symptômes irritatifs de la vessie²⁰. En revanche, même s'ils sont moins communs, les effets secondaires au niveau systémique peuvent être également observés et incluent de la fièvre, des malaises et le sepsis²⁰.

De plus, comme le régime de traitement du BCG dure trois ans, une grande proportion des patients, soit environ 65% (Figure 2), abandonnent les traitements en cours de route pour diverses raisons dont les effets secondaires²⁰. C'est pourquoi un traitement alternatif avec moins d'effets secondaires et ayant une efficacité similaire ou supérieure au BCG s'avère être une nécessité pour pouvoir aider les patients souffrant de ce type de cancer.

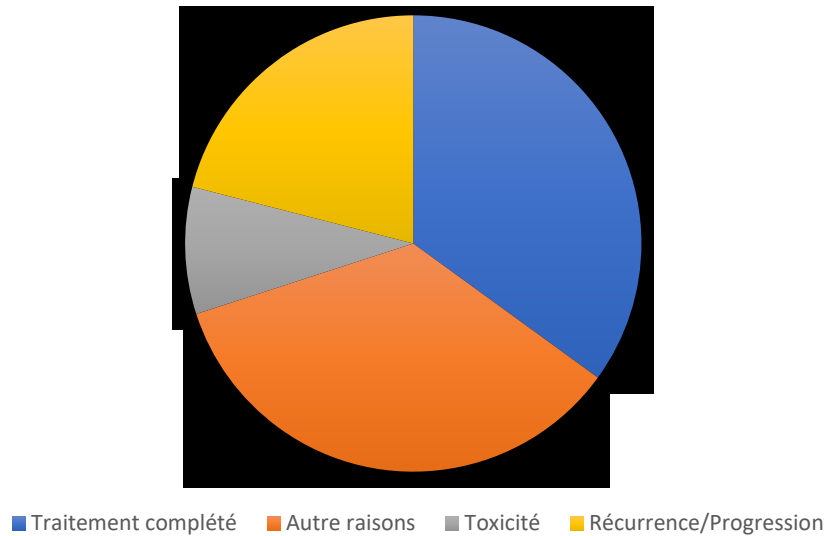


Figure 2 : Motifs d'arrêt du régime de traitement BCG au cours de la première année. Les pourcentages des patients ayant arrêté le régime de traitement BCG au cours d'une étude avec des patients randomisés. En gris, la toxicité, en jaune la récurrence ou progression, en orange des raisons autres et en bleu les patients de l'étude ayant complété la première année. (Figure modifié de Brausi et al. 2014)²⁰

1.3 Surveillance immunitaire du cancer

Le système immunitaire constitue un obstacle important pour le développement de tumeurs. Il s'agit de la première ligne de défense à laquelle les cellules cancéreuses doivent faire face avant de pouvoir proliférer. En soi, la prolifération tumorale peut se décrire en trois phases distinctes, suppression, équilibre, et évaison²¹. La première phase est l'étape critique qui détermine les phénotypes exprimés par les cellules cancéreuses. En effet, les cellules tumorales antigéniques sont négativement sélectionnées pour finalement favoriser la prolifération des cellules cancéreuses qui échappent à l'activation des cellules immunitaires²². Les mécanismes de reconnaissance et d'élimination des cellules tumorales ont lieu à plusieurs niveaux. D'une part les antigènes spécifiques sont métabolisés par les

cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules dendritiques ou les macrophages. La digestion des molécules tumorales par les cellules phagocytaires mène ensuite à la présentation de peptides par le biais du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMHII). La présentation du peptide est l'étape clé de l'interaction des cellules de l'immunité innée avec les cellules de l'immunité adaptative. En revanche, les cellules de l'immunité innée comme les cellules dendritiques ou les monocytes requièrent l'activation des motifs de reconnaissance moléculaires (PRRs *Pattern Recognition Receptors*)²³. L'activation des PRRs est nécessaire pour l'expression de molécules impliquées dans la costimulation. En effet, l'expression de CD80, CD86 et CD40 sont induites par l'activation des PRRs. En outre, les récepteurs de reconnaissance de patron moléculaire sont spécifiques à des molécules précises. Entre autre, les motifs moléculaires associés aux dommages (DAMPs *Damage Associated Molecular Patterns*) dont les protéines *High Mobility Group Box 1* (HMGB1) et l'ATP sont des stimuli menant à l'expression de molécules de costimulation ainsi qu'à la présentation de peptides via le CMHII²³. Les DAMPs sont une catégorie de molécules sécrétées par les cellules subissant des dommages importants au sein des structures cellulaires. L'interaction des cellules présentatrices d'antigènes avec les lymphocytes T CD4+ mène à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Les cytokines pro-inflammatoires causent l'infiltration de lymphocytes dans le micro-environnement tumoral. Ces lymphocytes sont des lymphocytes infiltrants les tumeurs (TILs) et comportent également des cellules effectrices telles que les cellules tueuses naturelles (NK) et les lymphocytes T CD8+. L'activation des cellules effectrices par les cellules présentatrices d'antigène mènent à une réponse immunitaire spécifique contre la tumeur²⁴. Les cellules effectrices ou cytotoxiques procèdent à l'élimination des cellules tumorales par le biais de

plusieurs molécules. Dans un premier temps, la perforine perce la membrane de la cellule cible ce qui permet la circulation libre des enzymes et autres molécules. Dans un second temps, le Granzyme B, une protéase à sérine, commence la digestion des composantes internes de la cellule et débute le mécanisme d'apoptose²⁵. Les voies activées par l'action de Granzyme B sont principalement celles des caspases 8 et 10. En revanche, la protéine agit sur d'autres substrats au sein de la cellule comme la matrice extracellulaire, la membrane mitochondriale et plus de 300 autres cibles menant à l'apoptose de la cellule ciblée²⁶. D'autre part, les cellules effectrices limitent la croissance tumorale par d'autres moyens que leur activité cytotoxique. Entre autres, l'expression de cytokines telles que les interférons type I et type III qui ont une activité antitumorale. Les interférons possèdent une activité antiproliférative en plus d'agir directement sur l'expression de récepteurs immunogéniques. En outre, les interférons favorisent l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de type I chez les cellules cancéreuses, ce qui mène à l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺²⁷. Également, les interférons type I mènent vers une réaction immunitaire de type Th1, ce qui favorise un phénotype cytotoxique chez les cellules immunitaires et contribue à inhiber la croissance tumorale²⁸. En somme, le système immunitaire est un outil important pour le contrôle de la croissance tumorale. C'est le cas autant pour son effet cytotoxique direct sur les cellules cancéreuses que par les cytokines ayant pour fonction une signalisation antiproliférative et une signalisation menant à un phénotype cytotoxique chez les cellules immunitaires effectrices.

1.4 Mécanismes d'évasion tumoraux du système immunitaire

Le micro-environnement tumoral représente un milieu particulier où dans le but d'éviter leur élimination par les cellules immunitaires, les cellules tumorales sécrètent une variété de facteurs visant à supprimer la réponse immunitaire qui permettrait de les éliminer. En soi, les cellules tumorales sont de nature antigénique. Elles expriment des néo antigènes qui peuvent être reconnus par les cellules cytotoxiques notamment, les cellules NK et les lymphocytes T CD8⁺²⁹. À la base, l'instabilité génétique des cellules cancéreuses favorise l'apparition d'épitopes uniques aux cellules cancéreuses. Les peptides présentés par le CMHII aux cellules cytotoxiques amènent la sécrétion de cytokines pro inflammatoires causant l'infiltration des cellules immunitaires³⁰. Ces interactions avec les leucocytes dans le micro-environnement immunogénique favorisent la sélection des cellules tumorales moins immunogéniques et donnent lieu à plusieurs stratégies d'évasion du système immunitaire. Notamment, la diminution de l'expression de molécules immunogéniques. D'un côté, l'expression de CMHI est diminuée, ce qui réduit les interactions avec les lymphocytes T CD8⁺³¹. D'un autre côté, la régulation négative des enzymes intermédiaires impliquées dans la présentation d'antigènes spécifiques aux cellules cancéreuses comme le transporteurs associés aux complexes protéiques (TAP Transporter associated with antigen processing) est aussi un moyen pour diminuer l'antigénicité²¹. La diminution de l'antigénicité des cellules tumorales leur permet de s'évader des interactions avec les cellules cytotoxiques et assure leur sécurité. Pareillement, la diminution de l'expression des récepteurs d'interférons est aussi une caractéristique commune des cancers. La liaison des récepteurs d'interférons mène à la présentation d'antigènes et induit une réduction de la réponse aux facteurs de croissance, ce qui représente des caractéristiques indésirables pour les cancers²⁷. De surcroît, les cellules tumorales ont souvent des mutations qui suppriment l'activité des enzymes impliquées dans

la mort cellulaire. Cette limite l'efficacité des cellules cytotoxiques et favorise la survie des cellules cancéreuses²¹. Par ailleurs, l'expression de cytokines donne des propriétés immunosuppressives aux cellules cancéreuses²¹. D'une part, les cytokines relâchées dans le micro-environnement tumoral favorisent le recrutement de cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) qui ont pour fonction d'inhiber la réaction immunitaire médiée par les TILs. De plus, la présence accrue des cellules T régulatrices (Tregs) contribue également à inhiber les fonctions cytotoxiques des cellules effectrices. D'autre part, l'expression de ligands visant à inhiber directement les lymphocytes effecteurs tels que PDL-1 et CTLA-4 est un autre moyen que les cellules tumorales utilisent afin d'éviter l'apoptose induite par une réaction immunitaire³². Effectivement, dans le but de limiter une éventuelle réaction auto-immune, les cellules immunitaires possèdent des points de contrôles permettant d'inhiber les cellules auto réactives. Cependant, dans le cadre de la tumorigenèse, les cellules cancéreuses tirent avantage de ces points de contrôle pour se défendre contre le système immunitaire de l'hôte³².

En résumé, les cellules cancéreuses évitent la réaction immunitaire qui leur est spécifique à plusieurs niveaux. Dans un premier temps, les cellules tumorales moins immunogéniques sont sélectionnées par la pression sélective occasionnée par le système immunitaire. Dans un second temps, le micro-environnement tumoral contient des cytokines visant à supprimer l'action des cellules effectrices autant par le recrutement de cellules à phénotype anti-inflammatoire que par l'utilisation directe des points de contrôle de la réaction immunitaire.

1.6 Immunothérapies pour le cancer de la vessie

1.6.1 Introduction du BCG

Le BCG était à l'origine un vaccin atténué contre la tuberculose. Le traitement intravésical du BCG est basé sur la bactérie provoquant la tuberculose bovine. Il est composé de bactéries de type bacille vivante ainsi que de débris cellulaires et de microorganismes morts³³. Les bactéries contenues dans le traitement possèdent sensiblement les mêmes propriétés que la lignée dont elles proviennent soit la sensibilité aux antibiotiques et le type réponse immunitaire provoquée³. Par contre, elles sont atténuées et sont donc moins virulentes^{34,35}. Le traitement du BCG, malgré l'incompréhension mécanistique, est employé pour traiter les cancers de la vessie non-invasifs depuis plusieurs décennies. Le traitement est administré sur une durée de trois ans. Il est administré selon le protocole de Lamm, ce qui implique 28 doses de BCG administrées sur une période de trois ans²⁰.

1.6.2 Mécanisme d'action du BCG pour le traitement du cancer de la vessie

Malgré que le mécanisme d'action du BCG reste à ce jour mal compris, certains effets du traitement sur les cellules immunitaires spécifiques et l'identité de certaines molécules impliquées sont connus. Le mécanisme d'action du BCG peut se diviser en trois sections distinctes soit : (1) l'infection des cellules urothéliales, (2) l'induction d'une réponse immunitaire et (3) l'activité antitumorale³³. Pour débiter son action (Figure 3), le BCG utilise les fibronectines et les intégrines $\alpha 5 \beta 1$ pour pouvoir s'ancrer à l'urothélium et par la suite être, internalisé par les cellules urothéliales¹⁶. La fixation et l'internalisation se fait de façon non-spécifique, c'est-à-dire autant au niveau des cellules cancéreuses que des cellules saines. Suite à l'internalisation de la bactérie, il y a deux possibilités. La première implique l'effet cytotoxique. Cet effet cytotoxique résulte en la lyse des cellules cancéreuses ce qui entraîne le relâchement de molécules attractantes pour les cellules immunitaires (Figure 4)¹⁶. Les

DAMPs ont un rôle pro-inflammatoire et mènent à la migration et l'activation des cellules immunitaires au niveau de la tumeur. Puis, suite à l'infection de la cellule, une hausse de l'expression de molécules telles que le CMH II et la molécule d'adhésion intercellulaire (ICAM-1) est observée¹⁶. Ainsi, les cellules infectées deviennent, elles-mêmes, plus immunogéniques. Par conséquent, elles sécrètent différentes molécules visant à attirer les cellules immunitaires au sein de la vessie telles que l'interleukine 8 (IL-8), le facteur de croissance des granulocytes et des monocytes (GM-CSF) et le facteur de nécrose tumorale (TNF α *Tumor Necrosis Factor*)¹⁶. Les cellules immunitaires impliquées dans la réponse antitumorales représentent la dernière étape mécanistique du BCG¹⁶. Puisque le BCG provoque une lyse cellulaire de l'urothélium et des cellules cancéreuses, il est probable que des antigènes spécifiques aux cellules tumorales soient libérés dans la vessie et qu'ils demeurent en circulation libre dans l'organe suite au traitement. La présence des antigènes spécifiques ainsi que des cytokines pro-inflammatoires mentionnés plus haut, expliquent la présence et l'importance des rôles respectifs des différentes cellules immunitaires. Dans un premier temps, les cellules phagocytaires telles que les cellules dendritiques immatures, les macrophages ainsi que les granulocytes sont les premières présentes au site du traitement¹⁶. Le rôle des granulocytes et des macrophages dans le cadre du traitement BCG est surtout la production de cytokines pro-inflammatoires visant à compléter celles produites par les cellules urothéliales infectées. Par contre, les macrophages peuvent aussi avoir une activité cytotoxique induite par les interférons γ (IFN γ) et TNF α ¹⁶. En ce qui concerne les cellules dendritiques, lorsqu'elles sont immatures, elles ont un rôle phagocytaire, ce qui leur permet de digérer les antigènes tumoraux spécifiques. Puis, une fois la maturation complétée, elles produisent des cytokines pro-inflammatoires. Ceci a pour effet d'activer la réponse

cytotoxique des lymphocytes T contre les cellules tumorales. Similairement, les cellules NK assument également un rôle cytotoxique. Enfin, les lymphocytes T CD4+ sont le type lymphocytaire prédominant suite au traitement et sont indispensables à la réaction immunitaire subséquente¹⁶.

En résumé, le traitement BCG fait appel autant aux cellules urothéliales qu'aux cellules immunitaires afin d'organiser une réaction immunitaire contre les cellules tumorales. Cette réaction a lieu autant au niveau des cellules lysées directement par la BCG que dans les cellules infectées qui expriment de façon induite des molécules immunogéniques.

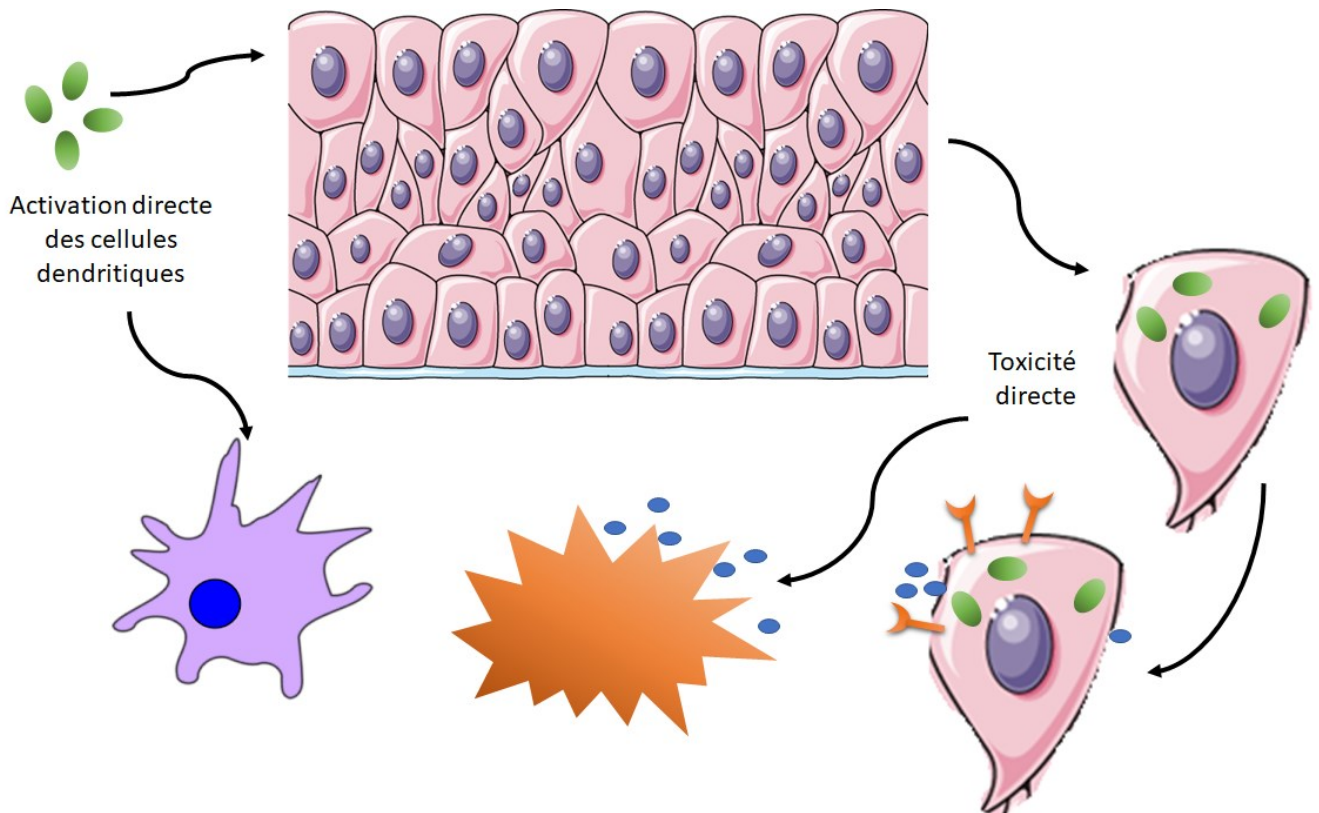


Figure 3 : Mécanisme d'action de BCG au niveau des cellules cancéreuses. Suite à l'introduction de BCG dans la vessie, la bactérie agit au niveau des cellules présentatrices d'antigènes et des cellules cancéreuses. Elle active les cellules immunitaires et mène à la lyse des cellules tumorales en plus de les rendre immunogénique en induisant l'expression de facteurs pro-inflammatoires (IL-12, TNF et $IFN\gamma$) ainsi que le CMHII. (Figure modifiée de Redelman et al. 2014)¹⁶

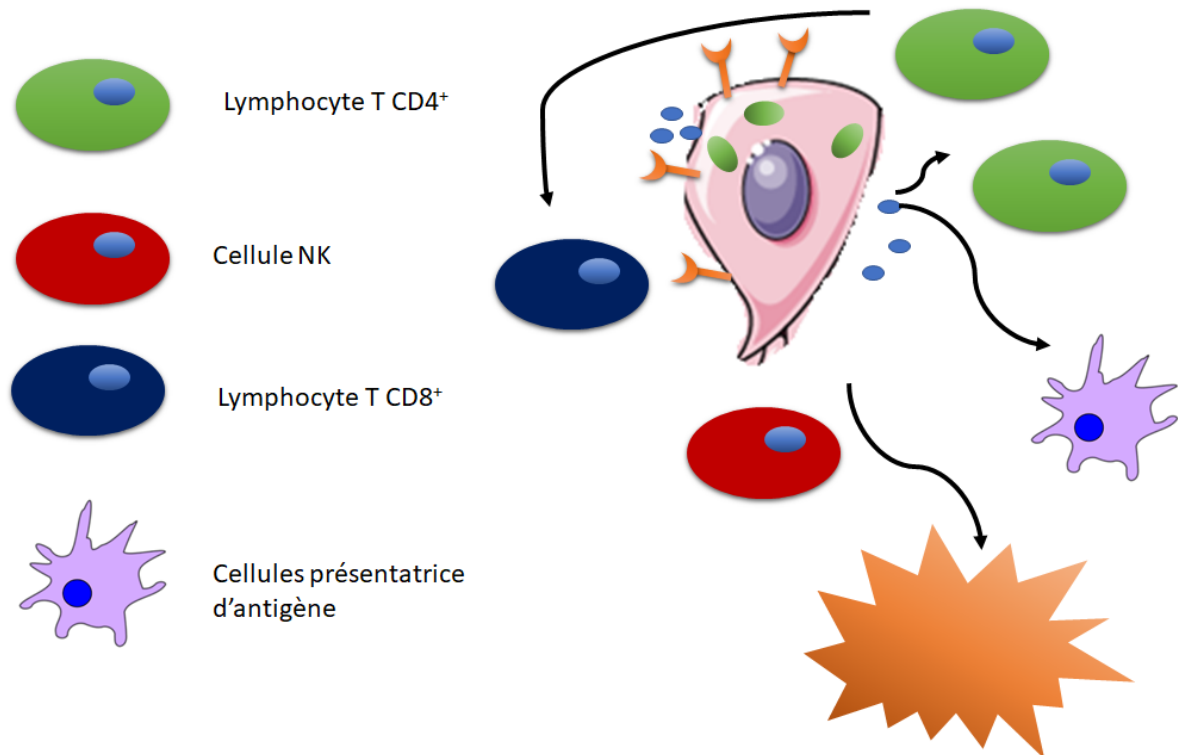


Figure 4: Mécanisme d'action de BCG au niveau des cellules immunitaires. Les cellules immunitaires activées par BCG interagissent avec les cellules cancéreuses au niveau du micro-environnement tumoral. Les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ activés par les cellules présentatrices d'antigène médient une réaction cytolytique. Les cellules NK sont aussi responsables de l'activité cytolytique ce qui mène à la destruction des cellules cancéreuses. (Figure modifiée de Redelman et al. 2014)¹⁶

1.6.3 Limites du traitement BCG

Le traitement au BCG, malgré ses lacunes, reste un traitement efficace pour contrer le cancer de la vessie. Cependant, lors de l'administration du traitement, des complications

peuvent survenir autant au niveau local qu'au niveau systémique²⁰. D'un côté, au niveau local, on peut observer de l'inflammation, de l'irritation, une hausse de la fréquence d'urination et du sang dans l'urine ²⁰. D'un autre côté, on observe au niveau systémique, de la fièvre, des malaises et des frissons ²⁰. En revanche, il peut être difficile d'affirmer la provenance des effets secondaires négatifs puisque ces derniers peuvent être associés soit aux effets normaux du traitement, soit aux effets de la toxicité des bactéries contenues dans le traitement. Cela rend ainsi la fenêtre thérapeutique difficile à définir précisément ²⁰. La toxicité du BCG reste une variable mal comprise et peut différer d'un patient à l'autre ²⁰. Majoritairement, les effets secondaires sont limités au niveau local alors que les effets secondaires systémiques sont plus rares. Le traitement, prévu pour une durée de trois ans, est souvent abandonné par une grande portion (65%) des patients au cours de la première année pour diverses raisons incluant la récurrence ou la progression de la maladie, l'inaptitude du patient à recevoir le traitement, la mort du patient ou simplement le refus du patients de poursuivre le traitement²⁰. Les moyens pour limiter la toxicité du BCG sont peu efficaces. Par conséquent, plusieurs patients ne peuvent pas bénéficier de l'effet thérapeutique du BCG³⁶. Il est donc primordial de trouver une alternative thérapeutique aussi efficace mais moins toxique.

Une alternative possible pour ces patients est le traitement par cytokines³⁷. Parmi les cytokines, on retrouve la classe des interférons, plus précisément les interférons de type I. Cette classe de molécules est sécrétée par les cellules immunitaires, comme les cellules dendritiques, et est responsable d'un nombre important d'évènements impliqués dans la réponse immunitaire. Parmi ceux-ci, il y a la hausse de l'expression des CMH I et II et de l'inflammation. En raison de ces propriétés, le traitement par IFN- α 2B est utilisé pour certains cancers urologiques³⁷. En revanche, l'IFN- α 2b à lui seul ne semble pas être plus

efficace au niveau oncologique que la chimiothérapie ou le BCG comme traitement du NMIBC³⁸. C'est pourquoi l'IFN-a2b est surtout utilisé pour les patients ne répondant pas adéquatement au BCG. Dans ces cas-là, il peut être administré seul ou en combinaison avec le BCG. La combinaison est possiblement associée à un résultat oncologique plus favorable que l'IFN-a2b seul étant donné que la cytokine induit une réaction immunitaire qui complète l'action du BCG et qui potentialise l'effet cytotoxique résultant³⁷. Cependant, cette solution est limitée puisque les cancers de la vessie plus agressifs ont un phénotype qui ne répond pas aux interférons³⁷. Donc, malgré le pronostic plus favorable issu de la combinaison BCG/interférons, une alternative est toujours de mise en raison de la toxicité accrue de cette combinaison³⁸.

1.7 Virus Oncolytiques (VO)

L'utilisation clinique des VO est une idée mise en œuvre depuis très longtemps. Effectivement, les virus ont été considérés comme agents thérapeutiques potentiels depuis le 20^e siècle³⁹. Ces pathogènes se répliquent spécifiquement dans les cellules cancéreuses tout en induisant des dommages limités chez les cellules saines. En revanche, les premières utilisations de VO ont été peu concluantes puisque sans manipulations génétiques pour les atténuer, ce sont des pathogènes potentiellement dangereux pouvant causer la virémie et la mort. Afin d'être efficaces, les VO doivent avoir certaines propriétés de bases. Entre autres, ils doivent se répliquer de façon spécifique dans les cellules tumorales en plus de pouvoir être éventuellement éliminés par le système immunitaire du patient. Pour ce faire, il faut tirer avantage des propriétés spécifiques aux cellules cancéreuses¹². L'une de ces propriétés est la réponse dysfonctionnelle aux interférons de type I. Les interférons, en plus de posséder des propriétés antivirales jouent des rôles physiologiques, notamment dans la transcription

de gènes reliés à la croissance cellulaire et l'angiogenèse⁴⁰. Donc, la sensibilité aux signaux, médiées par les interférons, est incompatible avec les propriétés des cancers⁴⁰. D'autre part, les interférons ont également le rôle de stimuler les gènes exprimant les complexes majeurs d'histocompatibilités. De ce fait, plusieurs cellules cancéreuses répriment cette voie, ce qui les protègent du système immunitaire mais, qui en contrepartie, les rendent plus vulnérables aux infections virales⁴⁰. En outre, dans le but d'échapper aux mécanismes d'inhibition de la réponse aux facteurs de croissance médiés par les interférons, les cellules cancéreuses doivent évoluer pour avoir une réponse atténuée aux signaux envoyés par les interférons⁴⁰. Alors, les cellules cancéreuses se retrouvent avec une réponse antivirale restreinte puisqu'elles ne peuvent réagir adéquatement aux signaux antiviraux. Donc, une réponse inhibée aux interférons de type I est une propriété répandue chez les cancers et est exploitée par les VO pour se répliquer spécifiquement dans les cellules cancéreuses⁴¹.

1.8 Mise en contexte de VSVδ51

Le VO de la stomatite vésiculaire (VSVδ51) est à l'origine de la famille des rhabdovirus avec pour principal vecteur les arthropodes⁴². D'ordinaire, il est surtout présent en milieu rural et affecte les populations bovines, chevalines et les rongeurs⁴². En revanche, ce virus possède aussi la capacité d'infecter les humains et peut infecter un spectre de tissus assez large⁴². VSVδ51 est un virus à ARN simple brin négatif et se réplique dans le cytoplasme ce qui lui confère la propriété de ne pas être génotoxique pour les cellules de l'hôte, ce qui représente un avantage pour son rôle en tant qu'agent thérapeutique en opposition aux virus à ADN⁴². Le système immunitaire joue un rôle crucial dans l'efficacité du traitement du cancer de la vessie avec le virus VSVδ51⁴⁰. D'une part, pour que VSVδ51 puisse infecter de façon spécifique les cellules cancéreuses, les cellules saines doivent avoir

un moyen de contrôler l'infection et comme il a été mentionné, VSV δ 51 est très susceptible aux signaux des interférons de type I, ce qui en fait un bon candidat pour un virus oncolytique idéal ⁴³. Effectivement, la protéine M exprimée par le VSV sauvage représente pour le virus un moyen de défense contre la réponse antivirale ⁴⁰. La protéine M agit en réprimant l'expression des gènes hôtes et en séquestrant les ARNm dans le noyau. Ceci perturbe, par le fait même, l'expression des gènes modulés par les interférons et donc réduit la réponse de l'hôte contre le virus ⁴⁰. Cependant, les mutants directs du virus sauvage VSV δ 51 (AV1 et AV2) induisent une réponse antivirale plus forte que le type d'origine, ce qui en font des candidats thérapeutiques plus sécuritaires ⁴⁰. Cette sécurité a été préalablement confirmée par des tests de toxicité sur des souris immunodéficientes qui ont démontré que malgré leur faiblesse immunitaire, les souris immunodéficientes peuvent tout de même éliminer le virus et survivre⁴⁴. D'autre part, pour que le traitement soit en mesure d'être efficace, il faut aussi considérer que le virus doit être présent dans l'organisme assez longtemps pour avoir une activité oncolytique satisfaisante ⁴⁰. En ce sens, la réponse immunitaire adaptative représente une limitation à l'administration de VSV δ 51 comme traitement du cancer de la vessie ⁴⁰. En outre, un des avantages de VSV δ 51 consiste au fait qu'il s'agit à l'origine d'un pathogène non-humain. Par conséquent, il est peu probable que des patients puissent avoir acquis préalablement une immunité contre VSV δ 51. C'est pourquoi il est préférable à d'autres VO tels que l'herpès simplex dont l'immunité est communément retrouvée dans la population. En revanche, plusieurs traitements de VSV δ 51 sont requis pour éradiquer complètement les cellules cancéreuses et la prise en considération de l'immunité adaptative est primordiale pour gérer l'efficacité du traitement ⁴⁰. Enfin, en observant l'interaction entre le VO et le cancer, on peut aussi remarquer l'apparition d'une immunité contre le cancer. Alors, les VO,

en forçant les interactions entre le système immunitaire de l'hôte et la tumeur, peuvent par le fait même forcer la reconnaissance des antigènes tumoraux par les leucocytes ⁴⁵. Donc, la mémoire immunitaire représente aussi un point important dans la lutte directe contre la tumeur. Le génome du virus code pour cinq protéines majeures. La nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P), la protéine matrice (M), la glycoprotéine (G) et la polymérase large (L) (Figure 5)⁴². Les protéines N, P, G et L sont toutes impliquées dans le mode d'infection et la réplication virale. Dans cet ordre d'idées, la glycoprotéine lie la surface cellulaire de l'hôte et permet la fusion des membranes, ce qui mène à l'internalisation du virus⁴². Son domaine de liaison se fixe sur la phosphatidylsérine, un phospholipide bien présent à la surface des cellules animales, ce qui confère au virus son tropisme⁴². La protéine N a pour fonction l'enrobage de l'ARN virale ce qui conserve son intégrité. Quant à elles, les protéines P et L, sont respectivement le cofacteur et la polymérase de l'ARN⁴². Enfin, la protéine M occupe de multiples fonctions qui concerne surtout la régulation de la transcription et le contrôle du transport de l'ARN messagers chez la cellule hôte⁴².

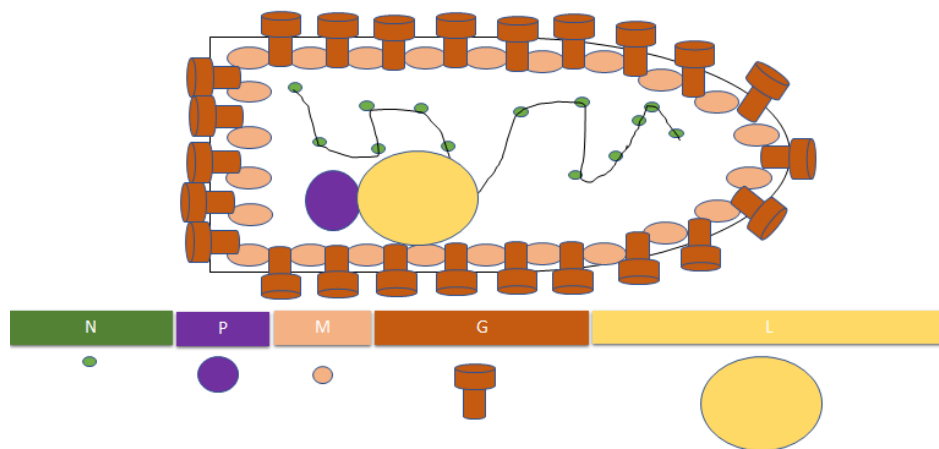


Figure 5 : Représentation du virus recombinant VSV δ 51. Structure du génome de VSV sauvage. La nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P), la protéine matrice (M), la glycoprotéine (G) et la polymérase large (L). Les protéines sont exprimées au sein du

cytoplasme de la cellule infectée et l'assemblage du virus se fait dans cet environnement ce qui donne une forme ressemblant à la cellule d'une cartouche. (Figure modifiée de Lytchy et al. 2004)⁴²

1.9 Mécanismes d'action de VSV δ 51

L'utilisation de VO pour traiter le cancer de la vessie tire son avantage du fait que l'agent pathogène infecte de façon prioritaire les cellules tumorales. Les mécanismes d'action d'un VO peuvent se définir en trois catégories majeures, la cytolysse directe des cellules tumorales, la cytolysse directe des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, et l'induction d'une réponse immunitaire dirigée contre la tumeur. La cytolysse directe dépend de plusieurs facteurs comme le tropisme du virus, le cycle lytique du virus, et la résistance des cellules tumorales au type de mort cellulaire provoquée par le virus³⁹. Le bon fonctionnement du cycle lytique des VO peut être attribué aux propriétés immunosuppressives du micro-environnement tumoral⁴⁶. Les voies majeures pour la reconnaissance des pathogènes internes sont intactes chez les cellules saines alors que les cellules cancéreuses ont des avantages prolifératifs lorsque plusieurs de ces voies sont non-fonctionnelles⁴⁷. Parmi ces voies, on retrouve l'implication des récepteurs de type toll (TLRs), les interférons (IFNs) et les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs)⁴⁷. Les PAMPs sont reconnus par les TLRs, ce qui mène à une cascade de réaction ayant pour but l'expression d'interférons de type I. L'activation du récepteur de l'interféron provoque ensuite la hausse de l'expression de protéines régulatrices du cycle cellulaire, ce qui limite la réplication virale dans les cellules saines⁴⁷. La régulation négative des protéines impliquées dans la croissance cellulaire confine l'expression du virus limitant ainsi l'expression et l'assemblage de virus. Par conséquent la propagation virale et la lyse cellulaire se font principalement au niveau des cellules cancéreuses et donc, dans le micro-

environnement tumoral (Figure 6)⁴⁷. Dans un autre ordre d'idée, l'approvisionnement en nutriments au sein d'une tumeur est réalisé par le biais de vaisseaux sanguins nouvellement formés⁴⁸. Donc, en infectant les cellules composant les vaisseaux sanguins, soit en cours de développement ou déjà développés, les VO privent les cellules tumorales de leur apport en nutriments (Figure 6)⁴⁸. Dans le cas de VSV δ 51, la destruction des vaisseaux sanguins se fait par le biais de leur obstruction. En outre, le virus cause une migration massive de neutrophiles au site de la tumeur, ce qui favorise la formation d'un caillot, diminuant ainsi le flux sanguin dans le micro-environnement tumoral⁴⁸. Puis, les VO forcent les cellules hôtes à exprimer des molécules immunogéniques créant ainsi un environnement pro-inflammatoire susceptible d'induire une réponse immunitaire antitumorale⁴⁶. Parmi ces molécules, on retrouve les PAMPs spécifiques au virus tels que les protéines de la capsid, l'ARN simple brin viral et les protéines virales. De plus, les DAMPs sont représentés par HMGB1, l'ATP, la calréticuline et les protéines de choc thermique. Également, on peut observer des cytokines telles que IL-12 et les IFNs de type I⁴⁷. La présence de l'ensemble des molécules induites par le VO est la base de la stimulation immunitaire. En outre, l'oncolyse combinée à la présence accrue de cellules immunitaires mènent à la présentation d'antigènes spécifiques aux cellules tumorales. Cette présentation se fait par les cellules présentatrices d'antigènes (APCs *Antigen Presenting Cells*) qui induisent l'activation des cellules effectrices comme les lymphocytes T CD8⁺ et les cellules NK. Ces derniers entraînent à leur tour la lyse des cellules cancéreuses (Figure 7)⁴⁷. Dans cet ordre d'idée, la réponse immunitaire générée par le VO est également spécifique au pathogène. Or, la biodistribution du virus est située majoritairement dans le micro-environnement tumoral. Par conséquent, les cellules infectées et éliminées sont surtout des cellules tumorales⁴⁷. En

somme, les VO possèdent une activité oncolytique mais leur efficacité est surtout basée sur l'activation du système immunitaire au sein de la tumeur.

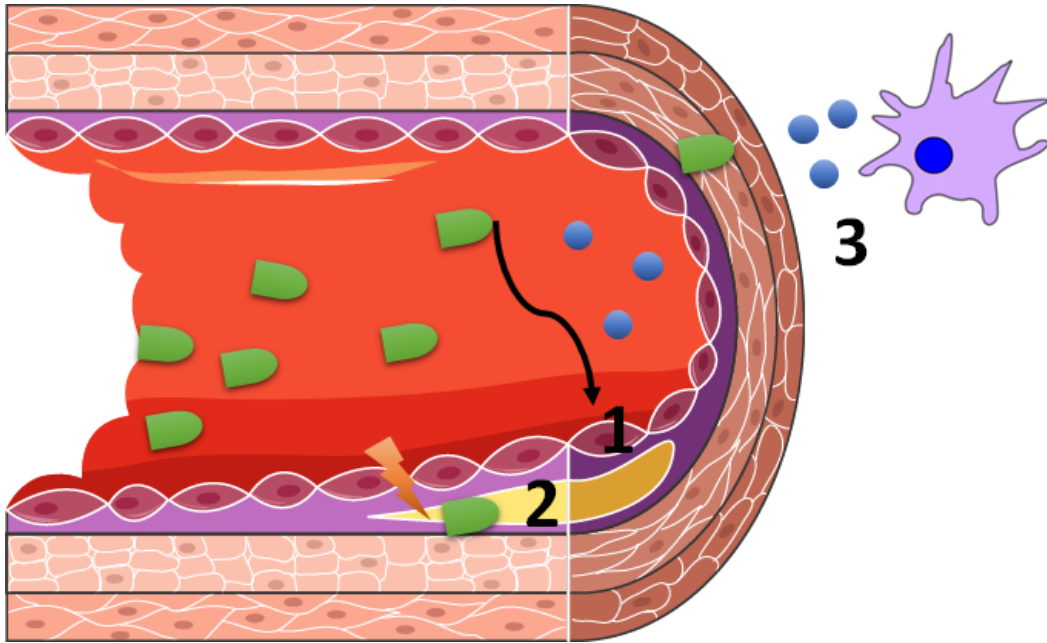


Figure 6 : Mécanismes d'action général des virus oncolytiques. 1) l'infection des cellules cancéreuses mène à la lyse directe de ces dernières 2) la propagation du virus dans le micro-environnement tumoral mène à la destruction des cellules composant les vaisseaux sanguins causant ainsi leur destruction, ce qui prive la tumeur de son apport en nutriments 3) les antigènes spécifiques aux tumeurs et les facteurs immunogéniques relâchés par les cellules infectées activent les cellules immunitaires, ce qui induit une réponse spécifique aux cellules tumorales. (Figure modifiée de Kirn et al. 2009)⁴⁹

1.10 Utilisation de VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF en immunothérapie

Les tumeurs sont dans leur ensemble des populations hétérogènes de cellules. De ce fait, une monothérapie traditionnelle à elle seule, ne peut être en mesure de cibler la totalité des mécanismes de résistance et tous les éléments permettant aux tumeurs de croître. Dans le contexte d'un VO, l'oncolyse n'est simplement qu'un seul des différents mécanismes

d'action et les effets résultants sur le système immunitaire sont plus importants que l'oncolyse à elle seule. Une des particularités importantes de ces agents thérapeutiques est qu'ils peuvent être modifiés en y insérant un transgène permettant d'accroître les propriétés activatrices du système immunitaire⁴⁶. Dans le but de rendre un VO plus efficace, le transgène peut être une cytokine pro-inflammatoire, ou bien une protéine visant à déstabiliser l'homéostasie tumorale⁴⁶. Un des transgènes d'intérêts est le GM-CSF. Son implication dans la différenciation des cellules dendritiques représente un atout⁴⁶. En effet, les cellules dendritiques différenciées sont plus aptes à présenter les antigènes spécifiques aux tumeurs, ce qui favorise le fonctionnement du mécanisme médié par le système immunitaire de destruction des cellules tumorales. De plus, le GM-CSF possède également des propriétés chimio attractantes. En outre, cette dernière propriété, mise dans le contexte d'un VO ayant un tropisme spécifique aux cellules tumorales, permet une inflammation ainsi qu'une migration accrue des cellules immunitaires au site de la tumeur⁵⁰. Par lui-même, le GM-CSF est multifonctionnel et sécrété par plusieurs types cellulaires, autant au niveau de l'immunité innée que de l'immunité adaptative⁵¹. Brièvement, le GM-CSF induit la maturation des monocytes en cellules dendritiques et induit, par la suite, leur maturation. Cette propriété activatrice des cellules présentatrices d'antigène permet d'obtenir un phénotype pro-inflammatoire focalisé sur la présentation d'antigènes. Ce phénotype accroît la réponse spécifique aux cellules tumorales et favorise l'élimination des cellules cancéreuses. Or, le GM-CSF est aussi responsable de l'activation et de la mobilisation des cellules myéloïdes⁵¹. Cet effet, sur les cellules de l'immunité innée, concerne, entre autres, les neutrophiles présents au niveau du micro-environnement tumoral, induisant ainsi leur survie. Les

neutrophiles peuvent à leur tour sécréter des cytokines pro-inflammatoires favorisant ainsi l'infiltration des cellules effectrices et la cytotoxicité tumorale.

En somme, GM-CSF possède intrinsèquement des propriétés thérapeutiques contre le cancer. Cependant, la cytokine intégrée au virus oncolytique potentialise le côté immunothérapeutique de VSV δ 51. Dans un premier temps, l'inflammation accrue au niveau du micro-environnement tumoral permet le recrutement de davantage de cellules immunitaires. Dans un second temps, les leucocytes mobilisés sont aidés par les cellules présentatrices d'antigène déjà activées. Cette mobilisation réduit le temps de réponse des cellules effectrices et peut favoriser un meilleur pronostic. Le mode de traitement par les VO est également à considérer. Dans le cas du cancer de la vessie, un traitement intravésical est préférable à une administration systémique pour plusieurs raisons. En effet, la localisation et la nature de la vessie en font un environnement plus fermé et déjà établi pour des traitements immunothérapeutiques⁵². Alors, puisque l'organe est facile d'accès, des titres élevés de virus peuvent y être introduit sans exposer systématiquement le patient à des effets toxiques. Aussi, la vessie est un organe immunologiquement sensible et la présence de cellules immunitaires peut être modulée avec facilité⁵². Pour ces raisons, un traitement de type intravésical est la voie de traitement idéale lorsqu'il s'agit de VO.

1.11 Mort cellulaire immunogénique

Les VO sont eux-mêmes considérés comme cytotoxiques et induisent la lyse des cellules cancéreuses. Cette mort cellulaire ainsi que les composantes impliquées dans cette dernière peuvent être caractérisées pour déterminer s'il s'agit d'une mort susceptible d'induire une réponse immunitaire⁵³. Or, plusieurs marqueurs de mort cellulaire immunogénique ont déjà été établis dans la littérature (Figure 7)³⁰. Donc, en déterminant si

ces marqueurs de mort immunogénique sont présents à la suite d'une infection des cellules cancéreuses par les virus oncolytiques, il est possible de confirmer le potentiel immunogène des agents infectieux. Les marqueurs de mort immunogénique sont variés. Ils incluent, notamment, l'infection virale des cellules tumorales induit le relâchement des DAMPs et de cytokines pro-inflammatoires susceptibles d'attirer les cellules immunitaires au niveau du micro-environnement tumoral. Parmi les DAMPs bien établis dans la littérature, on retrouve l'exposition de la calréticuline, *High mobility group box 1* (HMGB1) et l'adénosine triphosphate (ATP)⁵³. Cet ensemble de molécules interagit avec le système immunitaire sur plusieurs niveaux. Les DAMPs sont reconnus par les cellules immunitaires myéloïdes et lymphoïdes par l'entremise des récepteurs de surface. Lorsque cette reconnaissance a lieu, l'activité phagocytaire des cellules myéloïdes, comme celles des cellules dendritiques, est favorisée. De façon indirecte, l'activité phagocytaire augmentée agit en faveur de la présentation d'antigènes spécifiques aux tumeurs. Les cellules présentatrices d'antigène peuvent ensuite stimuler les cellules effectrices de l'immunité adaptative et médier une réponse cytotoxique avec comme cible les cellules tumorales.

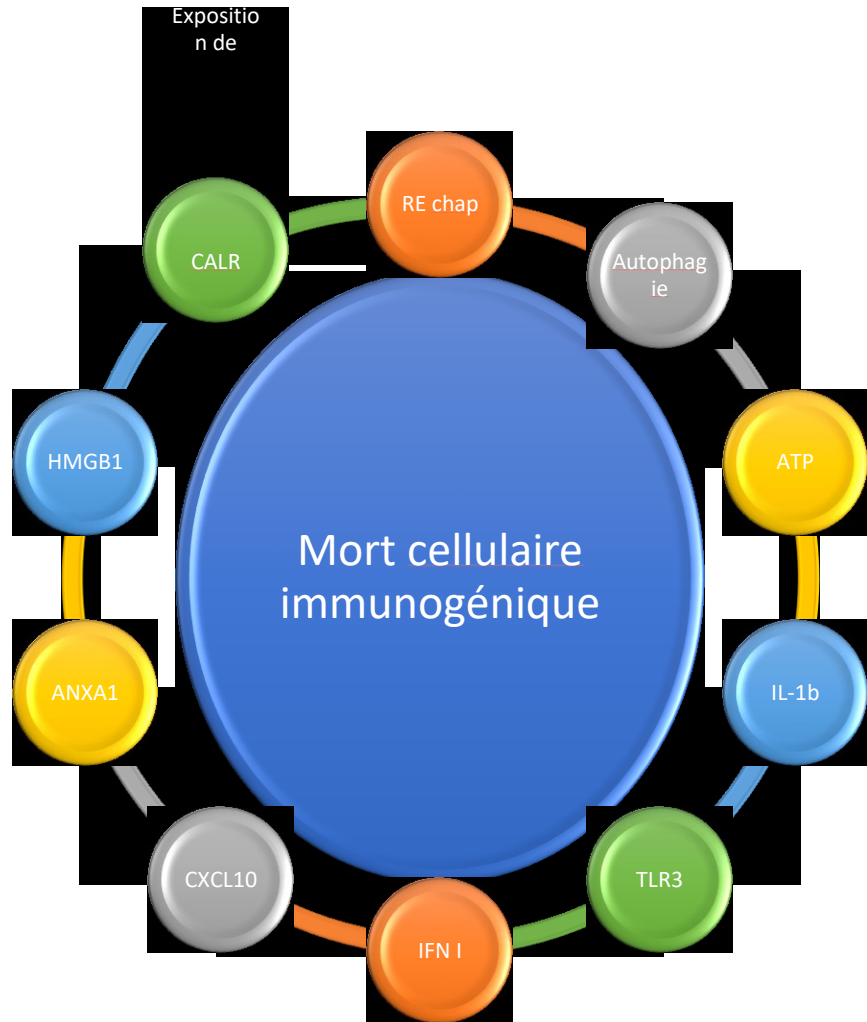


Figure 7 : Marqueurs généraux d'une mort cellulaire immunogénique. Plusieurs marqueurs établis peuvent indiquer le potentiel immunogénique d'une mort cellulaire. Notamment, l'exposition de la calréticuline, le relâchement d'ATP et de HMGB-1, l'autophagie, la présence d'interférons de type I, l'exposition d'annexine, le relâchement de la protéines 10 induites par les interférons gamma (*IP-10 interferon gamma -induced protein 10*). (Figure modifiée de Galluzi et al. 2017)⁵³.

2. Rationalisation du projet

Le cancer de la vessie représente un problème de santé important dont les effets se font sentir à plusieurs niveaux. La maladie affecte la société autant sur le système de santé que le système économique puisqu'elle requière des soins et une supervision soutenue sur une longue période. Malgré son efficacité, le système de traitement actuel, avec notamment l'utilisation de BCG intravésical, laisse place à un haut taux de récurrence et laisse une majorité de patients sans alternatives de traitement. L'immunothérapie médiée par le BCG fait appel à l'intervention du système immunitaire du patient pour son bon fonctionnement mais a pour principale lacune son manque de spécificité. L'alternative proposée, le VO VSV δ 51, possède des propriétés similaires au BCG. En outre, il induit chez les cellules cancéreuses le relâchement de molécules menant à l'inflammation et à une réponse immunitaire dirigée contre la tumeur. Cependant, les VO ont l'avantage principal de se répliquer de façon spécifique dans les cellules cancéreuses. De plus, ils possèdent la particularité d'opérer par plusieurs mécanismes distincts. Cette comparaison s'applique aussi aux autres types d'immunothérapies. Par exemple, les inhibiteurs de points de contrôle ou les IFN α n'ont pas la particularité d'être spécifiques aux cellules cancéreuses. De plus, certaines tumeurs ont de propriétés anti-inflammatoires et limitent l'infiltration de cellules effectrices. Ce facteur limitant représente un obstacle important à l'efficacité de ce type d'immunothérapie⁵⁴. C'est pourquoi les virus oncolytiques sont une option importante qui peut potentiellement être employée conjointement avec les autres immunothérapies. Les virus oncolytique peuvent contourner ces lacunes en forçant les tumeurs à relâcher des molécules immunogéniques. C'est pourquoi ce projet vise à caractériser, non seulement les molécules relâchées par les cellules cancéreuses après infection, mais également l'interaction

des cellules immunitaires avec ces agents pro-inflammatoires. Le tout permettra d'évaluer la possibilité d'utiliser VSV δ 51 comme traitement adjuvant à la résection transurétrale pour le cancer de la vessie non-invasif.

2.1 Hypothèses

Le traitement des cellules cancéreuses de la vessie avec VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF active les réponses immunitaires innées et adaptatives, ce qui entraîne une destruction accrue des cellules tumorales. Le traitement du cancer de la vessie par VSV δ 51-GM-CSF peut entraîner une augmentation accrue des niveaux d'activation immunitaire et donc une augmentation de la destruction des cellules tumorales comparativement au virus parental VSV δ 51.

2.2 Buts spécifiques

Ce projet comporte trois composantes clés qui sont le cancer de la vessie, le système immunitaire et le VO. Notre objectif principal étant la caractérisation de l'interaction entre ces trois composantes. Ainsi trois buts spécifiques ont été formulés : (1) déterminer si VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF peuvent infecter et tuer les lignées de cellules de cancer de la vessie humaines et de souris *in vitro*, (2) déterminer si la destruction des cellules cancéreuses de la vessie par VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF est immunogène *in vitro*, et (3) établir et caractériser un modèle syngénique et orthotopique de carcinome de la vessie chez la souris pour tester les effets de VSV δ 51 et de VSV δ 51-GM-CSF sur la survie, la croissance tumorale et les marqueurs d'activation des cellules immunitaires.

3. Matériels et méthodes

3.1 Culture Cellulaire : Les lignées cellulaires utilisées sont les UMUC3 et les 5636, elles proviennent de carcinomes urothéliaux humains de vessie. Les MB49 proviennent d'un carcinome murin de vessie. Les milieux utilisés sont le *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM) pour les UMUC3, le *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 pour les 5637 et le *Dulbecco modified culture medium* (DMEM) pour les MB49. Ces milieux sont tous supplémentés avec 10% FBS décomplémenté. Nous avons aussi ajouté une solution d'antibiotique pénicilline-streptomycine (Wisent bioproduct) pour obtenir une concentration finale de 1%.

3.2 Production de VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF: Les cellules Vero proviennent de cellules épithéliales de rein de singe vert d'Afrique. Elles sont utilisées pour la réplication des virus et sont cultivées dans du milieu DMEM contenant 10% de FBS décomplémenté et 34mM de HEPES (Wisent bioproduct). Préalablement à leur infection, une concentration de 1×10^6 cellules Vero sont cultivées dans une boîte de Pétri 15cm pendant 5 jours. Pour l'infection des cellules, le surnageant est aspiré et du milieu DMEM sans sérum et une quantité de 1×10^7 PFU du virus est ajouté. Par la suite, il y a une incubation d'une durée d'une heure où à la fin, le milieu sans sérum est aspiré et remplacé par du milieu DMEM complet. Ensuite, les cellules infectées sont laissées à 37°C pendant 24h. Le surnageant est ensuite collecté et 20mM d'EDTA y sont ajoutés pour prévenir les agrégats. Le surnageant est ensuite soumis à une centrifugation de 14000 rpm après quoi, le surnageant est aspiré et le virus culotté est dilué dans du PBS 1X (Wisent bioproduct). Les deux virus utilisés sont VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF. Puisque le génome du VSV est petit (de l'ordre de 11kb), l'utilisation de transgène devient limitée⁴². Donc, VSV δ 51 possède un transgène codant pour

la protéine fluorescente verte (GFP *green fluorescent protein*) et VSV δ 51-GM-CSF possède un transgène codant pour le facteur de croissance GM-CSF de souris.

3.3 Titrage des virus VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF : Une concentration de 5×10^5 cellules Vero sont cultivées dans des plaques 12 puits. Le virus purifié est ensuite soumis à des dilutions 1/10 successives de 10^{-2} à 10^{-12} dans du DMEM sans sérum. Ensuite, les milieux de culture des plaques de 12 puits sont aspirés et remplacés par les solutions de virus diluées pour être incubées à 37 degrés Celsius (37°C) pendant une heure. Ensuite le milieu avec virus est aspiré et remplacé par du milieu DMEM sans ajout contenant 0.5% d'agarose. La culture est laissée à 37°C jusqu'au lendemain. Par la suite, 1mL d'un mélange 3% méthanol/ acide acétique est ajouté et incubé à température pièce pendant une heure. Les plaques 12 puits sont ensuite rincées à l'eau courante et 1mL de 0.2% de violet de Crystal est ajouté. Les plaques sont ensuite incubées à température pièce pendant une heure et rincées à l'eau courante. La moyenne des plaques obtenue pour chaque dilution nous donne la concentration initiale du virus en unité formant des plaques (PFU).

3.4 Essais de viabilité cellulaire au sel de tétrazolium (essai MTT) : Une concentration de 3×10^4 cellules UMUC3 ou 5637 sont cultivées sur une plaque de 96 puits. Des dilutions pour 0, 0.001, 0.001, 0.1, 1 et 10 MOI sont préparées, le milieu de culture est remplacé par les dilutions de virus. Les cellules sont incubées une heure avec la dilution de virus qui est ensuite remplacée par le milieu approprié pour le type cellulaire. Suite à l'infection, les cellules sont incubées à 37°C pendant 72h. 15 μ L de solution de coloration (Promega G4000) sont ajoutés et les cellules sont incubées à 37°C pendant 2h. Ensuite, 100 μ L de solution stop (Promega G4000) sont ajoutés après incubation et après 1h, le contenu des puits est

homogénéisé et la mesure d'absorbance est prise, en utilisant la longueur d'onde de 570nm avec 650nm comme référence.

3.5 Caractérisation de la mort cellulaire : Les cellules UMUC3, 5637 et MB49 sont mises en culture à une concentration de 5×10^5 par puit dans une plaque de 12 puits. Le lendemain, le milieu de culture est aspiré et remplacé par du DMEM contenant des dilutions de virus correspondant à 0, 1 et 10 MOI sur une période d'une heure. Le milieu est ensuite remplacé par le milieu de culture correspondant à la lignée cellulaire utilisée. Les temps d'infection avant l'analyse sont de 4h, 24h, 48h et 72h. Lorsque les temps d'infection sont atteints, les cellules sont récoltées avec de la trypsine et un lavage avec 1mL de tampon de cytométrie en flux (Tampon phosphate salin (PBS *Phosphate Buffered Saline*))1X, 2% FBS, 1mM EDTA) est effectué. Un anticorps primaire lapin anti-calréticuline (ab2907, Abcam) est ensuite ajouté (dilution 1 :250 dans du tampon cytométrie en flux) et incubé pendant une heure. L'anticorps secondaire Alexa chèvre anti-lapin (A21244 Life tech) est ensuite ajouté à une dilution 1:2000. S'en suit une incubation de 30 minutes pour enfin ajouter un mélange contenant le colorant intracellulaire 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) à une dilution 1 :10000 et annexine-VPE (BD bioscience) dans une dilution 1 :100. Après cette étape, les cellules marquées sont prêtes pour la cytométrie en flux. Les acquisitions sont réalisées au cytomètre de flux de type Cytotflex™ de Beckman Coulter et les analyses sont effectuées à l'aide du logiciel CytExpert™. Les figures ont, quant à elles, été créées à l'aide du logiciel Graphpad Prism v.7.

3.6 Microscopie à fluorescence sur les cultures cellulaires infectées par le VSV δ 51: Les cellules UMUC3, 5637 et MB49 sont mises en culture à une concentration de 5×10^5 par puit

dans une plaque de 12 puits. L'infection se fait comme dans le protocole décrivant l'infection pour la caractérisation de la mort cellulaire. Une fois les temps d'infection atteints (4h, 24h, 48h et 72h), le microscope à fluorescence (Leica) est mis en marche. Les paramètres d'imagerie sont déterminés et une première image à champ clair est prise lorsque le microscope est configuré. Le filtre pour fluorescence verte est ensuite mis sans modification à la position des cellules et une seconde image est prise.

3.7 Microscopie électronique sur les cultures cellulaires infectées par le VSV δ 51: Les cellules UMUC3, 5637 et MB49 sont mises en culture à une concentration de 5×10^6 dans un pétris large de 15cm. L'infection se fait comme dans le protocole décrivant l'infection pour la caractérisation de la mort cellulaire. Une fois le temps d'infection atteint (72h), les cellules sont récoltées avec de la trypsine et sont centrifugées à 1500rpm pour une durée de 10 minutes. Le surnageant est aspiré et les cellules du culot sont fixées dans le glutaraldéhyde dans 0.1M de cacodylate de sodium à 4° C pendant la nuit. Les cellules sont rincées avec le cacodylate de sodium 0.1M et fixées dans du tétraoxyde d'osmium 2% et lavées à 4° C. Un marquage avec de l'acétate d'uranyle est effectué. Les cellules sont ensuite intégrées dans une résine (*Electron microscopy sciences*). Des coupes de 7×10^{-8} m à l'ultramicrotome sont effectuées. Les images sont prises avec a JEOL JEM 1010 e équipé avec une caméra CCD et le logiciel d'imagerie AMT-12HR.

3.8 Immunobuvardage pour détecter *High Mobility Group Box 1* (HMGB-1): Les cellules UMUC3, 5637 et MB49 sont mises en culture à une concentration de 5×10^5 cellules par puit dans une plaque de 12 puits. Des infections sont réalisées dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la caractérisation de la mort cellulaire. À l'atteinte des temps d'infection, les surnageants sont récoltés. Du tampon Leamli (5X) est ajouté (pour une

concentration 1X de tampon Leamli finale) la quantité de surnageant utilisée par condition est de 20µL. Le mélange est ensuite bouilli 3 minutes et est préparé pour la migration sur gel de polyacrylamide. Le blocage des membranes a été effectué dans une solution (lait en poudre 5%, 50 mM Tris, 0.15 M NaCl, 0.1 % Tween-20) pendant une heure. L'anticorps primaire (lapin anti HMGB1, ab 18256; Abcam) a été incubé avec la membrane scellée pendant une nuit à 4° C. L'incubation avec l'anticorps primaire se fait dans une dilution 1 :1000 avec la solution de blocage. Le lendemain, les lavages de membrane se font dans du TBS-T 0.05% et l'incubation avec l'anticorps secondaire 1 :1000 (*Peroxidase-conjugated Affinipux* Chèvre anti-lapin IgQ (H+L) (Jackson Immuno Research 11-035-144) se fait à température pièce pendant 45 minutes dans du TBS-T 0.05%. La révélation des membranes s'est faite avec le réactif ECL™ (GE Healthcare) selon les instructions du manufacturier. Les images ont été obtenues avec le logiciel ChemiDoc (Biorad).

3.9 Caractérisation de l'ATP dans les surnageants après infection des cellules : Les cellules UMUC3, 5637 sont mises en culture à une concentration de 5×10^5 cellules par puit dans une plaque de 12 puits. Des infections sont réalisées dans les mêmes conditions que pour la caractérisation de la mort cellulaire. À l'atteinte des temps d'infection, les surnageants sont récoltés. 100µL de surnageant sont pipetés dans une plaque 96 puits à fond blanc opaque. Le réactif r/L (Promega FF2000) reconstitué selon les instructions du manufacturier⁵⁵ est ajouté en quantité 1:1. Immédiatement la mesure de l'intensité lumineuse est mesurée à une longueur d'onde de 560 nm à l'aide d'un luminomètre. Les analyses sont faites avec le logiciel Graphpad Prism v.7.

3.10 Caractérisation de la migration des cellules effectrices humaines : Le montage de l'essai de migration est constitué de deux compartiments séparés par un filtre. Le

compartiment inférieur constitue le corps du montage et le filtre y est posé et le compartiment supérieur est ensuite vissé. Les surnageants récoltés après une infection sont pipetés dans le compartiment inférieur. Une membrane semi-perméable de 5µm est insérée entre les deux compartiments. Une concentration de 6×10^5 cellules mononuclées périphériques est pipetée dans la chambre supérieure du puit de migration. Le temps d'incubation pour la migration est de 45 minutes à température pièce. Après la migration, le contenu de la chambre supérieure est aspiré et le contenu de la chambre inférieure est récolté. Un premier lavage avec du tampon de cytométrie en flux est effectué. Ensuite, le marquage du contenu de la chambre inférieure est réalisé par le biais des anticorps suivants :

- FITC CD3 10µl/100µl de suspension cellulaire
- APC CD56 10µl/100µl de suspension cellulaire
- PE-CF 595 CD4 2.5µl/100µl de suspension cellulaire
- PE-CY5.5 CD8 2.5µl/100µl de suspension cellulaire

L'incubation est d'une durée de 30 minutes après quoi les cellules sont lavées avec le tampon de cytométrie en flux. Les acquisitions sont réalisées au cytomètre de flux de type Cytoflex™ de Beckman Coulter. Les analyses sont faites à l'aide du logiciel CytExpert™ Les analyses ont été faites avec le logiciel Graphpad Prism v.7.

3.11 Caractérisation de la polarisation des monocytes humains: Les surnageants récoltés après une infection des cellules UMUC3 ou 5637 sont utilisés pour cette manipulation. Des monocytes humains sont isolés à partir de sang humain en utilisant le kit d'isolation EasySep™ (Stemcell technologies) avec le séparateur de cellules Robosep™ (Stemcell technologies) selon les instructions du manufacturier. Une concentration de 5×10^5 monocytes est pipetée dans une plaque de 24 puits et incubés à 37°C pendant 24h. Ensuite

les monocytes sont incubés avec les surnageants des cellules infectées pour 24h. Les cellules sont récoltées dans des tubes de cytométrie en flux. Le marquage des monocytes se fait avec les anticorps suivants :

- PE-CF594-CD163 (BD#562670) 1µL/100µL de suspension cellulaire)
- APC-PD-L1 (CD274) (1µL/100µL of de suspension cellulaire)
- PE-CD80 (3µL/100µL de suspension cellulaire)
- PE-Cy7 HLA-DR (1µL/100µL de suspension cellulaire)
- BV421- récepteur mannose (CD206) (1µL/100µL de suspension cellulaire)
- BV605-CD86 (1µL/100µL de suspension cellulaire)
- Alexa 700 souris anti-humain CD14 (ebio#56-0149-42) (1µL/100µL de suspension cellulaire)

Le marquage est d'une durée de 30 minutes. Les cellules sont lavées une dernière fois et sont analysées au cytomètre. Les acquisitions sont réalisées au cytomètre de flux de type Cytoflex™ de Beckman Coulter. Les analyses sont faites à l'aide du logiciel CytExpert™ et les analyses ont été faites avec le logiciel Graphpad Prism v.7.

3.12 Caractérisation des ARNm: Une concentration de 3×10^6 cellules MB49 a été infectée dans des conditions d'infection de 0 et 10 MOI pendant 15h dans une plaque de 12 puits. Une fois l'infection terminée, les cellules infectées ont été collectées en ajoutant aux puits vides 1mL de de trizol (Themorfisher). L'ARN contenu dans le trizol a été séparé par le biais d'une centrifugation de 130000 RPM pendant 15 minutes à 4° C avec du chloroforme (0.2mL de chloroforme par mL de trizol). Ensuite l'ARN a été précipité dans du propanol avec une incubation à température pièce de 10 minutes suivie d'une centrifugation de 13000 RPM pendant 15 minutes à 4° C. Le surnageant est ensuite jeté et 0.75mL d'éthanol 75% sont ajoutés à la solution qui est, dans un second temps, lavée et recentrifugée à 13000 RPM pendant 10 minutes à 4° C. Puis, l'éthanol est aspiré. Le culot est resuspendu dans 16µL d'eau

nano pure pour ensuite être chauffé à 60°C pendant 5 minutes. L'ARN est ensuite dosé à 230, 260 et 280nm. L'ARN est incubé avec la transcriptase inverse (Quiagen) selon les instructions du fabricant pour obtenir des ADN complémentaires correspondants. Les amorces ont été établies à partir de la fonction Blast sur NCBI. L'acquisition de données s'est faite à partir d'un appareil à PCR quantitative en temps réel (Biorad). Les analyses ont été faites avec le logiciel Graphpad Prism v.7.

Séquence des amorces :

Gène	Amorce directe (5' > 3')	Amorce inverse (5' > 3')
Csf2	GTCGTCTCTAACGAGTTCTCC	GGGCTATACTGCCTTCCAAC
H2-D1	GTGCTGCAGAGCATTACAAG	ATGTAAGAGTCAGTGGACGG
H2-K1	ATACCTGAAGAACGGGAACG	TCCAAGGACAACCAGAACAG
CCL2	GCAGAGAGCCAGACGGG	ACAGCTTCTTTGGGACACCT
Cxcl10	CTAGCTCAGGCTCGTCAGTT	CCCTTGGGAAGATGGTGGTT

3.14 Caractérisation par ELISA des protéines relâchées par les cellules tumorales murines infectées : Des cellules MB49 infectées dans les mêmes conditions et temps que pour la caractérisation des ARNm ont été utilisées pour ces manipulations. Les anticorps (Preprotech 900-K55) ont été reconstitués selon les instructions du fabricant. La plaque d'ELISA a été préparée en ajoutant 100µL d'anticorps reconstitués pour une concentration finale de 1µg/mL dans du PBS 1X et scellée. Elle a ensuite été incubée à température pièce pendant la nuit. Quatre lavages ont été effectués avec le tampon de lavage (Preprotech 900-

K55) et 300µL du tampon de blocage (Preprotech 900-K55) sont ajoutés et la plaque est incubée à température pièce pendant une heure. Les dilutions de standard et des surnageants sont préparés et 100µL sont ajoutés aux puits. Une incubation de deux heures à température pièce s'ensuit. Quatre lavages sont faits et l'anticorps de détection est ajouté en une concentration de 0.25µg/mL. La solution est ensuite incubée pendant deux heures à température pièce. Quatre autres lavages sont faits et 100µL du conjugué Avidine-HRP sont ajoutés à la solution qui est ensuite incubée pendant 30 minutes à température pièce. Par la suite, quatre autres lavages sont faits et 100µL du substrat ABTS (Preprotech) sont ajoutés pour la coloration et des mesures à 405nm sont prises à cinq minutes d'intervalle pour établir la courbe. Les analyses sont faites à partir du logiciel Graphpad Prism v.7.

3.15 Modèles syngéniques orthotopiques de cancer de la vessie

Le modèle syngénique de souris consiste essentiellement en une représentation orthotopique du cancer de la vessie. D'une part, un élément important à souligner est que la souris est pourvue d'un système immunitaire fonctionnel et comporte tous les éléments qui s'y rapportent. D'autre part, l'induction du cancer de la vessie chez l'animal est aussi orthotopique, c'est-à-dire dans la vessie. En revanche, la méthode d'induction de la maladie est variable dans le modèle syngénique et peut être réalisée de différentes façons. L'une de ces façons consiste à introduire des agents mutagènes dans l'organe tels que la nitrosamine. Ces agents causent des dommages à l'ADN et favorisent la formation de cellules tumorales⁵⁶. Cependant, l'implantation directe d'une lignée cellulaire préétablie par la première méthode et représente un moyen plus efficace et reproductible. La reproductibilité du modèle syngénique constitue sa principale force puisque les souris composant le modèle ainsi que les lignées cellulaires qui leur correspondent sont fiables et bien établies. De plus, l'immunocompétence des animaux impliqués est aussi importante puisque nous pouvons

étudier la croissance des tumeurs et les effets de la thérapie en présence d'une immunité intacte. Ainsi, les facteurs pouvant influencer négativement une expérimentation se retrouvent limités. Ces éléments sont importants à considérer dans l'établissement des modèles orthotopiques de cancer de la vessie.

3.16 Établissement des tumeurs de la vessie orthotopique du modèle murin : Une protection absorbante propre est placée sur un '*Deltaphase isothermal pad*'. Ce '*Deltaphase isothermal pad*' et la protection absorbante sont placées sous le système d'anesthésie avec des cônes nasaux multiples qui seront utilisés pour livrer l'isoflurane de maintien durant toute la procédure. Pour des raisons techniques, seulement des souris femelles ont été sélectionnées pour l'intégralité du projet. Chaque souris est d'abord anesthésiée par inhalation d'isoflurane dans une chambre d'induction (2-3 min à 3% isoflurane). Quand la souris est jugée inconsciente (vérifié par la perte du réflexe de pincement d'orteil), elle est transférée au système multiple d'anesthésie. On s'assure que chaque souris est dans un cône nasal, dans une position couchée sur le dos et placée sur le '*Deltaphase isothermal pad*' pour maintenir sa température corporelle. La concentration d'isoflurane est maintenue à 2 % pendant toute l'anesthésie. Une crème ophtalmologique est appliquée sur les yeux pour prévenir l'assèchement de la cornée. Un cathéter veineux pédiatrique stérile (24G) est lubrifié avec un gel lubrifiant non irritant (K-Y) et l'aiguille est retirée. Le pouce et l'index de la main sont utilisés pour étendre les jambes de la souris et exposer le méat urétral. Le cathéter est inséré doucement dans l'urètre à un angle de 45°, puis l'angle est changé afin d'être parallèle à la surface du banc pour insérer le cathéter entièrement. La concentration d'isoflurane est ensuite réduite à 1 %. À l'aide d'une pipette P200, l'urine est enlevée de la vessie en appliquant la pression à la sortie du cathéter. L'urine résiduelle est enlevée du

cathéter et est jetée. Le cathéter est laissé sur place et 80 µL d'une solution de trypsine (0.125 %, 1:2 dilutions de 0.25 % trypsine dans le DMEM) est pipetté soigneusement au centre du cathéter. Une seringue (1 ml) remplie d'air est attachée au centre de cathéter. Le plongeur est déprimé de 0.1-0.2 ml pour livrer la trypsine dans la vessie. La seringue et le cathéter sont laissés en place pendant 15 minutes. Après 15 minutes, la seringue est détachée du cathéter. 50 µL de cellules de cancer de vessie murine (1×10^6 MB49) sont pipettés dans le centre du cathéter, puis une seringue (1 ml) remplie d'air est attachée au centre de cathéter. Le plongeur est déprimé de 0.1-0.2 ml pour livrer les cellules dans la vessie. La seringue et le cathéter sont laissés en place pendant 50 minutes. Après 50 minutes, la seringue et le cathéter sont doucement retirés de l'urètre. La concentration d'isoflurane est ensuite cessée et la souris est retournée à sa cage lorsqu'elle a regagné son réflexe de correction.

3.17 Traitement intravésical avec VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF : Les dilutions de virus sont préparées (5×10^8 unités PFU) dans 50 µl de 1X PBS. Les souris sont anesthésiées comme décrites dans l'établissement des tumeurs. Les traitements sont effectués deux jours après implantation pendant trois jours consécutifs. Les souris sont cathétérisées et l'urine est retirée. 50 µL du virus sont pipettés soigneusement au centre du cathéter. Une seringue (1 ml) remplie d'air est attachée au centre de cathéter et le plongeur est déprimé 0.1-0.2 ml pour livrer le virus dans la vessie. La seringue et le cathéter sont laissés en place pendant 30 minutes. Après 30 minutes, la seringue et le cathéter sont retirés de l'urètre. La concentration d'isoflurane est ensuite cessée et la souris est retournée à sa cage lorsqu'elle a regagné son réflexe de correction.

3.18 Implantation et visualisation des tumeurs de la vessie en modèle murin par échographie : Chaque souris est d'abord anesthésiée par inhalation d'isoflurane dans une

chambre d'induction (1 min à 3% isoflurane), puis la souris est transférée sur la plateforme d'échographie (système Vevo3100, Visualsonics) permettant le maintien de la température corporelle à 37°Celsius. L'anesthésie à l'isoflurane (0.5-1%) est maintenue en continu à l'aide d'un cône nasal durant toute la procédure. Une crème ophtalmologique est appliquée sur les yeux pour prévenir l'assèchement de la cornée. Une crème dépilatoire est appliquée sur l'abdomen inférieur (caudale) de l'animal, qui sera retirée après 2 minutes à l'aide d'une gaze. La peau épilée est nettoyée et rincée complètement à l'eau afin d'éviter l'irritation provoquée par la crème dépilatoire. À l'aide de l'appareil échographique, nous avons observé les différentes tranches de vue pour la mesure des paramètres de la tumeur (dimension de la tumeur). Une vessie peut comprendre entre 133 et 300 images selon ses dimensions et une image est prise à chaque 0.5mm. Chaque souris est ensuite retournée à sa cage d'origine pour le réveil.

3.19 Prélèvement sanguin des souris : À l'aide d'un dispositif de contention, les souris sont piquées avec une aiguille 25G. 150 à 200µL de sang sont pipetés dans un tube contenant 2µL d'EDTA 0.5M. Le contenu du tube est bien mélangé et transféré dans un tube contenant 5mL de tampon de cytométrie en flux. Le second tube est ensuite centrifugé et le surnageant en est aspiré. 5mL de tampon de lyse ACK (*Ammonium-Chloride-Potassium*) (NH₄Cl 150mM, KHCO₃ 10mM et EDTA 0.1mM dilué dans de l'eau et maintenu à un pH de 7.2 à 7.4) sont ajoutés et incubés à température pièce pour une durée de 5 minutes. Une centrifugation de 500g pendant 7 minutes est effectuée pour ne garder que le culot qui est ensuite resuspendu dans 130µL de RPMI enrichi.

3.20 Dissociation de la rate souris en une suspension cellulaire : La rate est extraite au jour 5 post-traitement après euthanasie de l'animal. L'organe est ensuite écrasé dans un filtre

70µm et rincé avec du tampon de cytométrie en flux. Le filtrat est centrifugé et resuspendu dans du tampon de cytométrie en flux pour que les cellules soient comptées. Une centrifugation est effectuée et le culot est resuspendu pour obtenir une suspension cellulaire avec une concentration de 2×10^6 cellules pour 100µL.

3.21 Dissociation de la vessie en une suspension cellulaire : La vessie est extraite au jour 5 post-traitement après l'euthanasie de l'animal. Les enzymes de digestion D, R et A (Miltenyl 130-096-730) sont ajoutées à 2.35mL de RPMI 1640. L'organe est découpé avec des lames de rasoir jusqu'à l'obtention de morceaux ayant un diamètre de 2mm. Les morceaux sont transférés avec les enzymes de digestion dans un tube GentleMACS (Miltenyl) conique. Le dissociateur GentleMACS (Miltenyl) est utilisé pour les cycles de digestion enzymatique avec le programme 37°C_m_TDK_1 (programme appliqué par l'appareil de dissociation impliquant une agitation soutenue ainsi que trois phases d'agitation rapide). La digestion complétée, la suspension obtenue est filtrée par le biais d'un filtre 70µm et rincée avec 2mL de tampon cytométrie en flux pour un comptage de cellules. Le compte de cellules est effectué par l'entremise d'un hématimètre et une coloration au bleu de trypan (sigma 200-786-7). Une centrifugation est faite dans le but de récupérer le culot qui est resuspendu pour obtenir une concentration cellulaire de 2×10^6 cellules pour 100µL.

3.22 Stimulation avec PMA/Ionomycine pour la cytométrie de flux: La solution de stimulation est composée de paraméthoxyamphétamin (PMA) dilué 1 :10000 et de Ionomycine 1 :500 dans un total de 100µL. Des cellules provenant de prélèvements sanguins murins, de la rate ou de la vessie dissociée, 100µL sont pipettés dans une plaque de 96 puits. 100µL de la solution de stimulation sont ajoutés aux puits. La Brefeldine A 1000X est ensuite ajoutée dans un volume correspondant à une concentration finale de 1X. La stimulation est

d'une durée de 4h à une température de 37°C. Une fois l'incubation terminée, les cellules sont récoltées dans des tubes de cytométrie en flux et un premier lavage avec du tampon de cytométrie en flux est fait. 2.5µL du bloqueur de la portion Fc BD (#553142) sont ajoutés et incubés à température pièce pendant dix minutes. Par après, les cellules sont marquées avec les anticorps suivants :

1. BV510 Hamster américain anti-souris CD80 (BD#740130) 1µL/100µL de suspension cellulaire
2. PE-Cy5.5 Hamster américain anti-souris CD3 (BD#551163) 1µL/100µL de suspension cellulaire
3. PE-CF594 rat anti-souris CD4 (BD#562285) 1µL/100µL de suspension cellulaire
4. BV605 Hamster américain anti-souris CD69 (#BD563290) 1µL/100µL de suspension cellulaire
5. BV711 Hamster américain anti-souris CD11c (#BD563048) 1µL/100µL de suspension cellulaire
6. BV421 rat anti-souris CD86 (#BD740034) 1µL/100µL de suspension cellulaire
7. APC rat anti-souris CD4 (#BD 553051) 1µL/100µL de suspension cellulaire
8. Alexa 700 rat anti-souris CD8a (ebioscience 56-0081-82) 0.6µl/100µL de suspension cellulaire
9. PE rat anti-souris NK1.1 (ebioscience 12-5941-81) 1µl/100µL de suspension cellulaire

L'incubation avec les anticorps de marqueurs extracellulaires est d'une durée de 30 minutes à 4°C. Une fois l'incubation terminée, un second lavage avec le tampon de cytométrie en flux est effectué. Les cellules sont ensuite fixées en ajoutant une solution de fixation / perméabilisation (BD 554714) 250µL. La fixation est de 20 minutes et mise à terme lorsque la solution de lavage (BD 554714) est ajoutée. Un second lavage est effectué avec la même solution et les cellules sont prêtes pour le marquage intracellulaire. Les anticorps de marqueurs intracellulaires sont :

1. PC7 rat anti-souris IFN-gamma (#BD557649) 1µL/100µL de suspension cellulaire

2. APC rat anti-souris Granzyme B (ebioscience #17-8898-82) 0.6µL/100µL de suspension cellulaire

Une incubation de 30 minutes avec ces anticorps à une température de 4°C est effectuée. Enfin, les cellules sont lavées avec le tampon de cytométrie en flux et sont passées au cytomètre pour analyse. Les acquisitions sont réalisées au cytomètre de flux de type Cytotflex™ de Beckman Coulter. Les analyses sont faites à l'aide du logiciel CytExpert™ et les figures, à l'aide du logiciel Graphpad Prism v.7.

3.23 Déplétion pharmacologique des cellules effectrices : Les anticorps de déplétion InVivoPlus anti-souris NK1.1 (Cedarlane) et InVivoMab anti-souris CD8α (Cedarlane) sont dilués dans du PBS 1X pour obtenir une concentration de 250µg/100µL. Ces anticorps sont administrés par voie péritonéale et des prélèvements sanguins sont effectués le lendemain pour déterminer si les populations immunitaires ciblées ont été déplétées. Les prélèvements sont marqués avec les mêmes procédures que celles décrites précédemment :

1. PE-Cy5.5 Hamster américain anti-souris CD3 (BD#551163) 1µL/100µL de suspension cellulaire
2. Alexa 700 rat anti-souris CD8α (ebioscience 56-0081-82) 0.6µl/100µL de suspension cellulaire
3. PE rat anti-souris NK1.1 (ebioscience 12-5941-81) 1µl/100µL de suspension cellulaire

4. Résultats

4.1 Caractérisation de la mort cellulaire induite par les virus VSV δ 51 sur les lignées cellulaires humaines de cancer de la vessie et VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF sur la lignée cellulaire murine de cancer de la vessie.

4.1.1 Susceptibilité des lignées cellulaires humaines du cancer de la vessie à l'infection par VSV δ 51 et de la lignée murine de cancer de la vessie avec VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF.

Les cellules tumorales sont particulièrement susceptibles à des infections virales puisque les voies de signalisation requises pour prévenir la réplication virale sont souvent absentes chez ces cellules. Or, le cycle viral va souvent de pair avec la mort cellulaire. La présence de DAMPs suite à la cytololyse est un bon indicateur du caractère immunogénique de la mort cellulaire⁵⁷. Afin de caractériser les propriétés immunogènes de la mort cellulaire

induites par les virus VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF chez les lignées tumorales de cancer de la vessie, nous avons inoculé les lignées cellulaires en culture avec les virus à des concentrations de 0, 1 et 10 MOI. Dans le cas du virus VSV δ 51, l'expression du transgène de protéine fluorescente verte (GFP *Green Fluorescent Protein*) a pu être déterminée par microscopie à fluorescence. Les résultats des lignées cellulaires humaines UMUC3 et 5637 (Figure 8A et 9A) ont démontré que la protéine GFP était exprimée. Il en est de même pour la lignée de souris, les MB49 (Figure 10A) pour laquelle nous avons observé des résultats similaires. La présence de GFP, suite à l'infection virale, suggère dans un premier temps que VSV δ 51 est capable d'infecter les cellules tumorales. Dans un second temps, la présence de GFP indique que le virus VSV δ 51 est aussi en mesure d'exprimer son transgène au sein des lignées cellulaires de cancer de la vessie. L'expression du transgène est importante puisqu'elle suggère également que le VSV δ 51-GM-CSF possède aussi la capacité d'exprimer le GM-CSF, potentialisant ainsi son caractère immunogène. Dans le but de confirmer la capacité des virus VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF à induire la mort cellulaire chez les cellules tumorales de la vessie, des images ont été prises à l'aide d'un microscope électronique à transmission. Nous avons démontré que, suite à une infection de 72h des lignées cellulaires UMUC3 et 5637 par 10MOI de VSV δ 51 (Figure 8B et 9B), des corps apoptotiques ainsi qu'une membrane plasmique endommagée sont observés. Comparativement au contrôle non-infecté, la destruction globale des organelles observée confirme l'activité oncolytique de VSV δ 51 sur les lignées cellulaires humaines. Chez les MB49 (Figure 10B), l'infection avec VSV δ 51 a produit des résultats similaires à ceux des cellules humaines où on observait une fragmentation de la cellule avec une structure globale préservée. Dans le cas d'une infection avec VSV δ 51-GM-CSF, les structures cellulaires ont

subi des dommages plus importants où la membrane plasmique ne pouvait plus être distinguée des débris. Une illustration de ce qui était retrouvé dans l'ensemble des coupes obtenues est représenté dans Figure 10B.

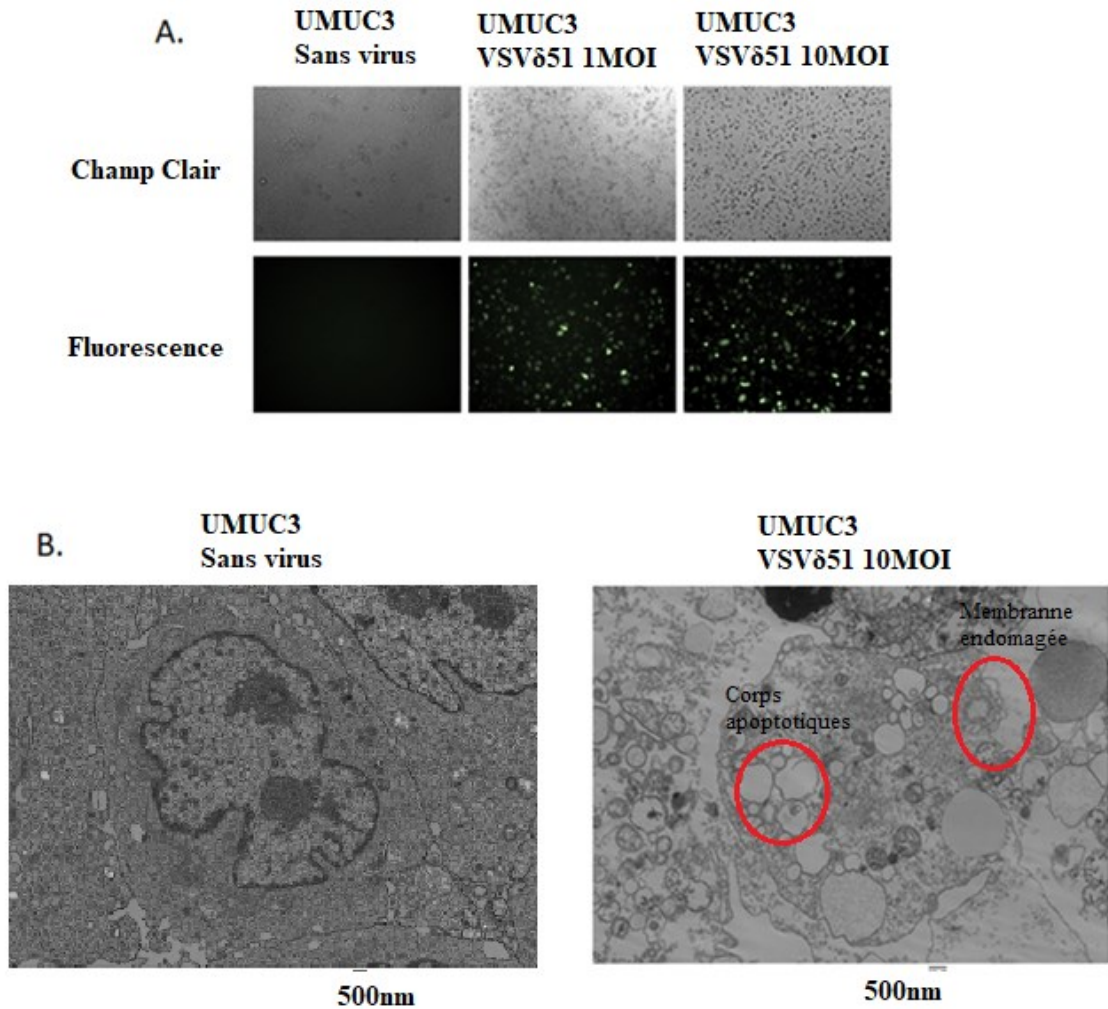


Figure 8 : Détermination de l'expression du transgène viral et de la mort cellulaire chez la lignée cellulaire humaine de cancer de la vessie UMUC3 : A) Détermination de l'expression du transgène GFP du virus VSV δ 51 chez les UMUC3 en comparant les images de microscopie en fluorescence avec les images prises en champ clair par l'entremise d'un agrandissement 25X B) Détermination de la mort cellulaire induite chez les UMUC3 par microscopie électronique par l'entremise d'un agrandissement 3000X (gauche) et 2500X (droite). Les images sont représentatives de 3 expériences.

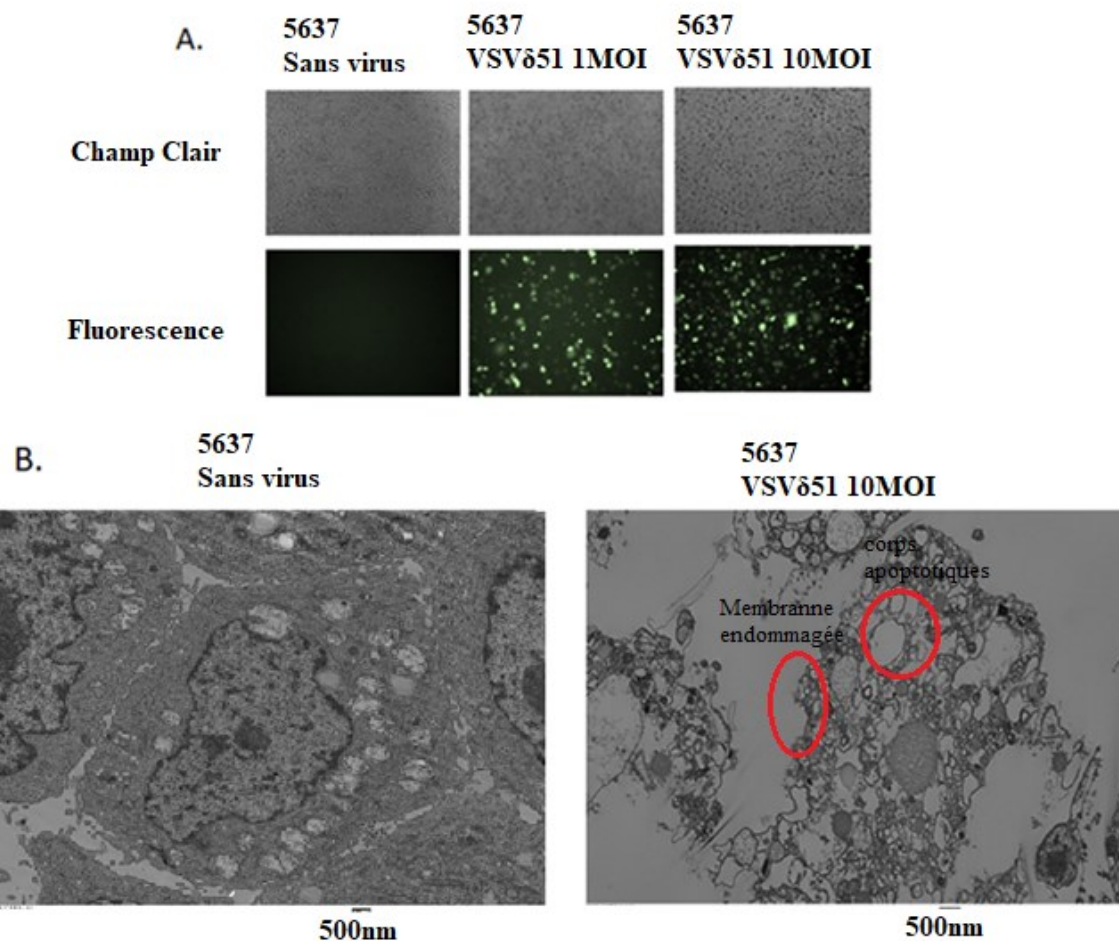


Figure 9 : Détermination de l'expression du transgène viral et de la mort cellulaire chez la lignée cellulaire humaine de cancer de la vessie 5637 : A) Détermination de l'expression du transgène GFP du virus VSV δ 51 chez les 5637UMUC3 en comparant les images de microscopie en fluorescence avec les images prise en champ clair agrandissement 25X B) Détermination de la mort cellulaire induite chez les 5637 par microscopie électronique. Agrandissement 3500X (gauche) et 4000X (droite). Les images sont représentatives de 3 expériences.

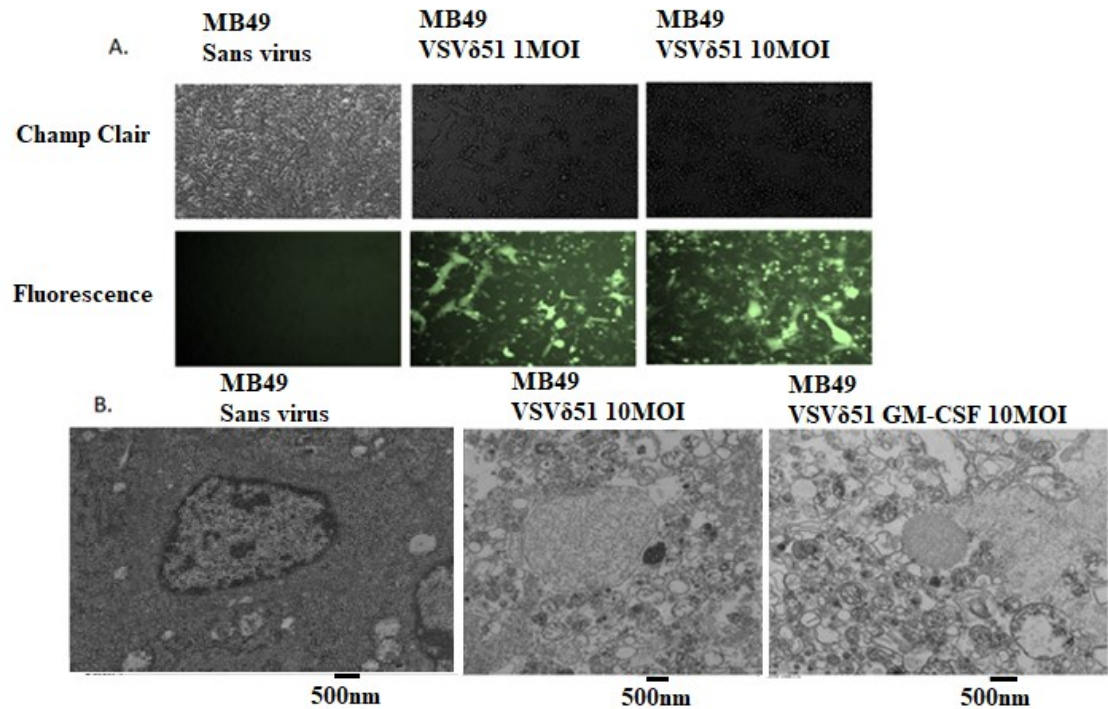


Figure 10 : Détermination de l'expression du transgène viral et de la mort cellulaire chez la lignée cellulaire murine de cancer de la vessie MB49 : A) Détermination de l'expression du transgène GFP du virus VSV δ 51 chez les MB49 en comparant les images de microscopie en fluorescence avec les images prise en champ clair agrandissement 25X B) Détermination et comparaison de la mort cellulaire induite par VSV δ 51 et VSV δ 51 GM-CSF chez les MB49 par microscopie électronique. Agrandissement 5000X (gauche), 5000X (centre) et 8000X (droite). Les images sont représentatives de 3 expériences.

4.1.2 Caractérisation de l'effet cytotoxique de VSV δ 51 sur les lignées cellulaires humaines.

Puisque nous avons observé les effets cytotoxiques du virus VSV δ 51 sur les lignées cellulaires du cancer de la vessie, nous avons voulu quantifier la diminution de la viabilité cellulaire après l'infection (Figure 11). La quantification a été réalisée par le biais du sel de tétrazolium (MTT) Ce composé, lorsque métabolisé par les mitochondries, se transforme en formazan, un composé mauve détectable par dosage de densité optique. Suite à une infection de 72h des cellules tumorales humaines avec des quantités croissantes de virus VSV δ 51, nous avons remarqué que la viabilité cellulaire diminuait avec les titres croissants de virus.

Nous avons aussi observé qu'à partir du titre de 0.1 MOI, la viabilité cellulaire demeurait stable et ce, malgré l'infection avec des titres plus élevés de virus.

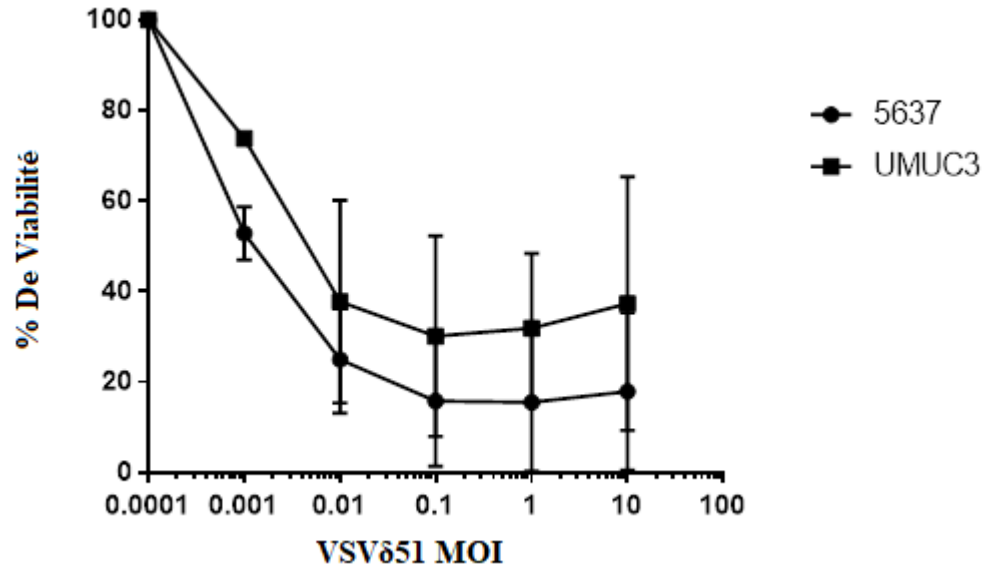


Figure 11 : Caractérisation des effets VSVδ51 sur la viabilité des lignées cellulaires humaines : Les UMUC3 et 5637 ont été infectées pendant 72h avec des quantités croissantes de virus. La viabilité a été mesurée par le biais d'un essai MTT comme décrit dans la section matériels et méthodes. Les courbes et la figure sont représentatives de trois expériences. Les courbes ont été obtenues avec le logiciel Graphpad Prism v.7.

4.1.3 Caractérisation de la mort cellulaire induite par les virus par VSVδ51 dans les lignées humaines du cancer de la vessie UMUC3 et 5637 et par VSVδ51 et VSVδ51-GM-CSF dans la lignée murine du cancer MB49.

Le type de mort cellulaire a ensuite été déterminé par cytométrie en flux. Pour distinguer entre l'apoptose et la nécrose, nous avons employé trois marqueurs distincts. L'annexine V, est une protéine avec une affinité pour la phosphatidylsérine⁵⁸. Cette protéine a une localisation intracellulaire dans une cellule intacte. Cependant durant l'apoptose, il y a un inversement de la membrane cellulaire et elle peut donc être détectée à la surface des cellules apoptotiques. La calréticuline est une protéine du réticulum endoplasmique faisant partie des marqueurs de mort immunogénique⁵³. Il s'agit d'une protéine chaperonne du réticulum

endoplasmique exposée à la surface de la cellule lorsqu'il y a mort cellulaire et également détectable par cytométrie en flux. Enfin, le 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) est une molécule fluorescente avec une forte affinité pour l'ADN est détectable lorsqu'il y a perforation des membranes cellulaires et donc perméabilisation de la cellule. Or, les trois marqueurs employés différencient l'apoptose de la nécrose puisque la nécrose implique une destruction de la membrane cellulaire permettant à DAPI d'être détecté. De plus, l'annexine V est spécifique à l'apoptose. Par conséquent, l'apoptose se définit par cytométrie en flux comme DAPI⁻ et Annexine⁺ et la nécrose comme DAPI⁺ Calréticuline⁺. Donc, en infectant les cellules tumorales avec les virus, nous pouvons déterminer la présence de ces trois marqueurs pour différencier le type de mort cellulaire induit. Pour les UMUC3 (Figure 12), nous observons une majorité de cellules avec le profil DAPI⁻ et Annexine⁺ et une minorité avec le profil DAPI⁺ Calréticuline⁺. Ce résultat suggère un profil de mort cellulaire principalement apoptotique et il en est de même pour les lignées 5636 (Figure 13) et les MB49 (Figure 14) lorsque VSV δ 51 est l'agent impliqué. En revanche, VSV δ 51-GM-CSF induit chez les MB49 un type de mort cellulaire majoritairement nécrotique avec le profil DAPI⁺ Calréticuline⁺ (Figure 15).

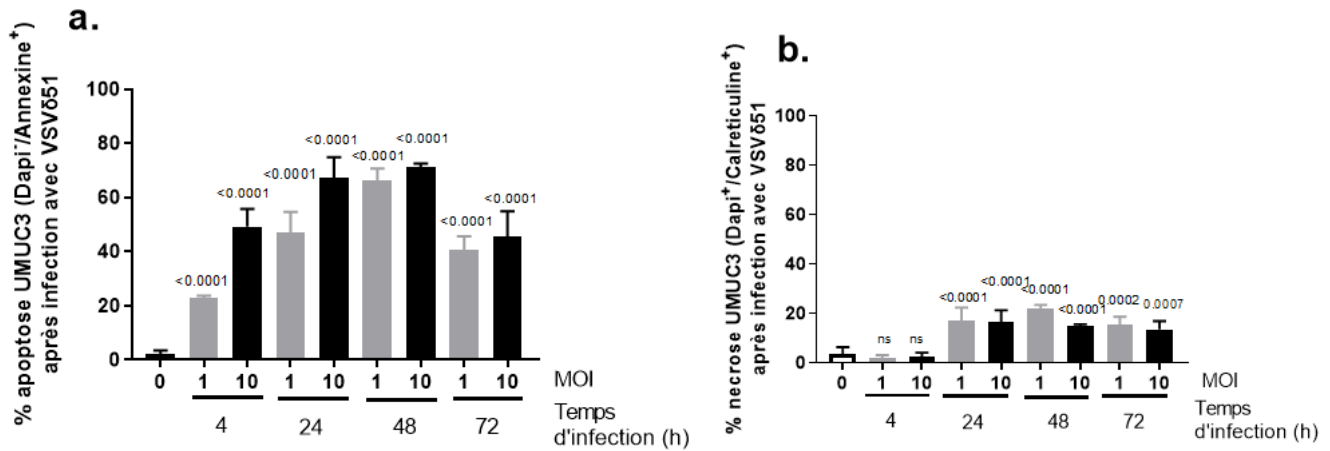


Figure 12 : Caractérisation par cytométrie en flux de la mort cellulaire induite par VSV δ 51 chez les UMUC3 : a) Proportion de cellules UMUC3 ayant le marqueur apoptotique annexine V sur la surface externe de la membrane plasmique non-perméabilisée. b) Proportion de cellules UMUC3 ayant le marqueur nécrotique calréticuline à la surface de la membrane plasmique perméabilisée. En blanc la somme de toutes les conditions sans virus, en gris 1 MOI, en noir 10 MOI. Les statistiques proviennent de test T de student et les valeurs p sont indiquées au-dessus de chacune des conditions qui sont comparées au contrôle sans infection (0 MOI). La figure est représentative de 3 expériences.

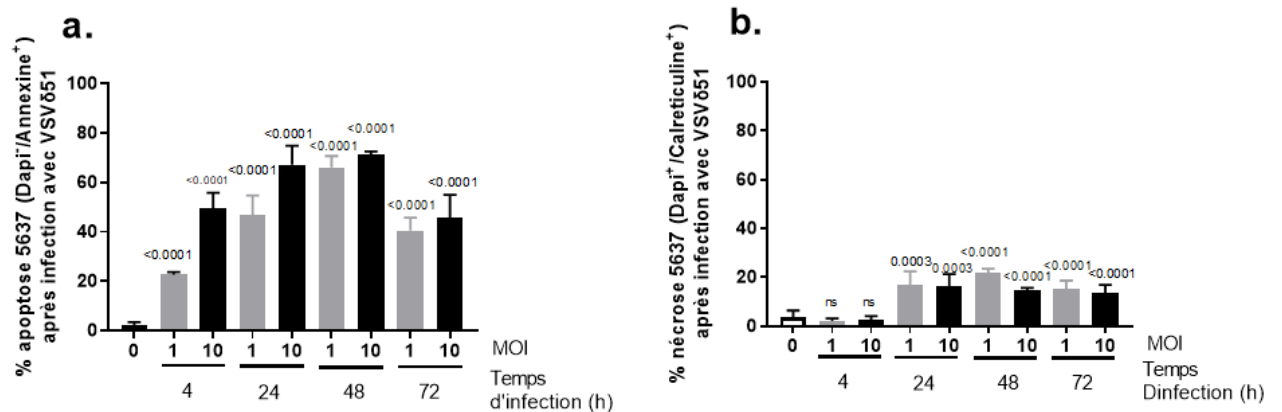


Figure 13 : Caractérisation par cytométrie en flux de la mort cellulaire induite par VSV δ 51 chez les 5637 : a) Proportion de cellules 5637 ayant le marqueur apoptotique annexine V sur la surface externe de la membrane plasmique non-perméabilisée. B) Proportion de cellules 5637 ayant le marqueur nécrotique calréticuline à la surface de la membrane plasmique perméabilisée. En blanc la somme de toutes les conditions sans virus, en gris 1 MOI, en noir 10 MOI. Les statistiques proviennent de test T de student et les valeurs p sont indiquées au-dessus de chacune des conditions qui sont comparées au contrôle sans infection (0 MOI). La figure est représentative de 3 expériences.

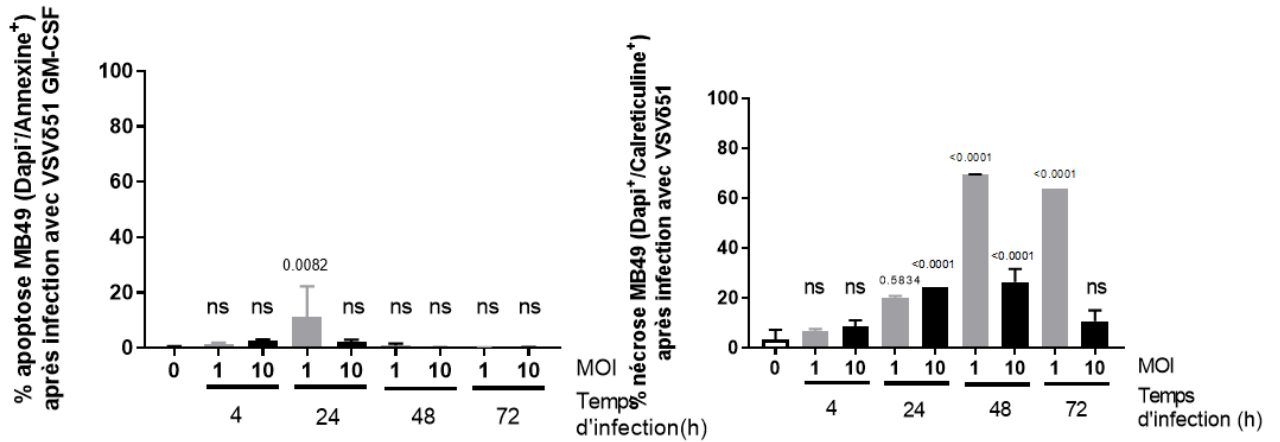


Figure 14 : Caractérisation par cytométrie en flux de la mort cellulaire induite par VSVδ51 chez les MB49 : a) Proportion de cellules MB49 ayant le marqueur apoptotique annexine V sur la surface externe de la membrane plasmique non-perméabilisée. B) Proportion de cellules MB49 ayant le marqueur nécrotique calréticuline à la surface de la membrane plasmique perméabilisée. En blanc la somme de toutes les conditions sans virus, en gris 1 MOI, en noir 10 MOI. Les statistiques proviennent de test T de student et les valeurs p sont indiquées au-dessus de chacune des conditions qui sont comparées au contrôle sans infection (0 MOI). La figure est représentative de 3 expériences.

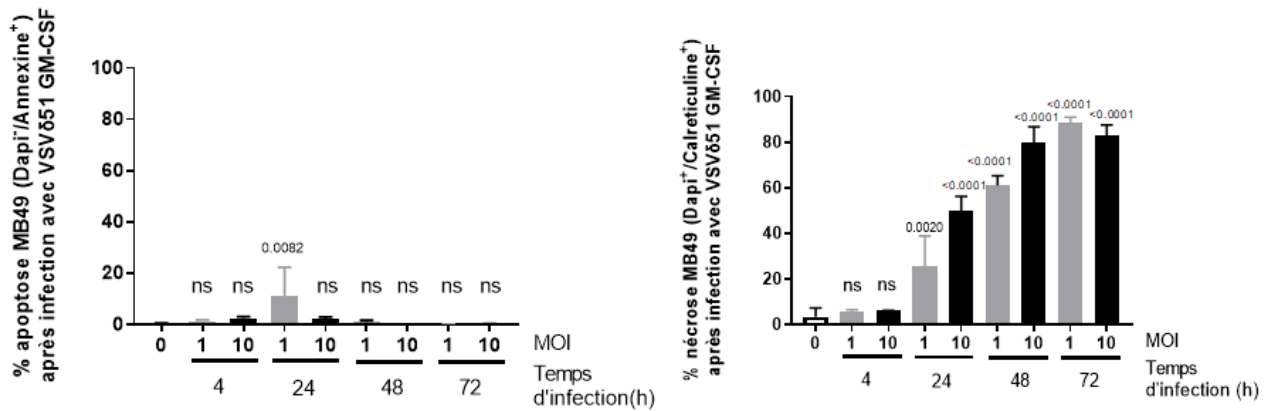


Figure 15 : Caractérisation par cytométrie en flux de la mort cellulaire induite par VSVδ51 GM-CSF chez les MB49 : a) Proportion de cellules MB49 ayant le marqueur apoptotique annexine 5 sur la surface externe de la membrane plasmique non-perméabilisée. B) Proportion de cellules MB49 ayant le marqueur nécrotique calréticuline à la surface de la membrane plasmique perméabilisée. En blanc la somme de toutes les conditions sans virus, en gris 1 MOI, en noir 10 MOI. Les statistiques proviennent de test T de student et les valeurs p sont indiquées au-dessus de chacune des conditions qui sont comparées au contrôle sans infection (0 MOI). La figure est représentative de 3 expériences.

4.1.4 Caractérisation du relâchement de HMGB1 après infection par VSVδ51 dans les lignées humaines du cancer de la vessie UMUC3 et 5637 et par VSVδ51 et VSVδ51-GM-CSF dans la lignée murine du cancer de la vessie MB49.

L'un des marqueurs de mort immunogénique important est le relâchement de la protéine HMGB1⁵⁷. Cette protéine nucléaire est exprimée constitutivement et joue un rôle important dans l'inflammation. En outre, la protéine HMGB1 est reconnue par plusieurs récepteurs comme les TLR2 et les TLR4⁵³. Cette protéine chaperonne a un effet pro-inflammatoire et agit sur une grande variété de populations cellulaires autant au niveau des cellules présentatrices d'antigène de l'immunité innée qu'au niveau des cellules effectrices de l'immunité adaptative. C'est pourquoi le DAMP est considéré comme un important marqueur de mort immunogénique. Pour détecter la présence de HMGB1, nous avons fait un immunobuvardage en utilisant le surnageant provenant de cultures cellulaires infectées

par VSV δ 51 et VSV δ 51 GM-CSF. Dans les lignées UMUC3, nous avons observé que cette protéine est présente 24h après infection de 1 MOI (Figure 16). Nous avons observé des résultats similaires dans les lignées 5637 (Figure 16) et MB49 (Figure 17) qui ont préalablement été infectées par VSV δ 51 et VSV δ 51 GM-CSF. D'une part, la confirmation de la présence de HMGB1 après infection confirme le potentiel immunogénique de la mort cellulaire induite par les agents infectieux. D'autre part, les observations au niveau des lignées MB49, nous permettent d'affirmer que le virus possédant le transgène possède également une activité oncolytique comme le virus parental.

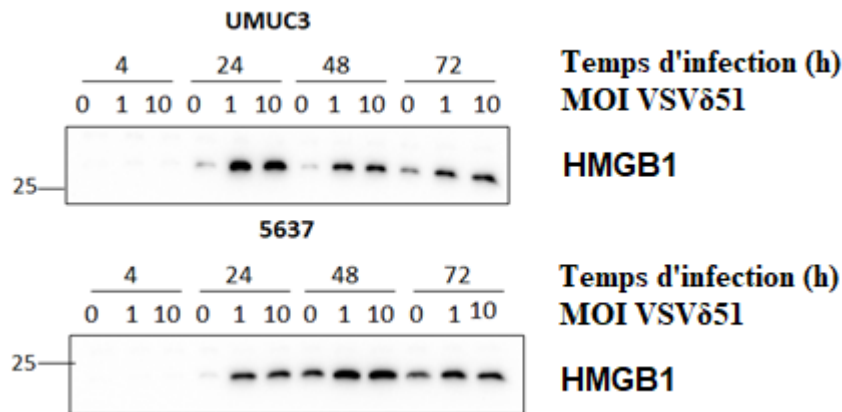


Figure 16 : Caractérisation de la présence du DAMP HMGB1 suite à une infection par VSV δ 51 dans les lignées cellulaires humaines UMUC3 et 5637 : Immunobuvardages effectués à des temps variant de 4h à 72h dans trois conditions d'infection 0,1 et 10MOI. Les surnageants ont été prélevés pour déterminer la présence de la protéine dans les surnageants cellulaires cancéreuses de la vessie humaine infectées. Les images d'immunobuvardage présentées sont représentatives de 3 expériences.

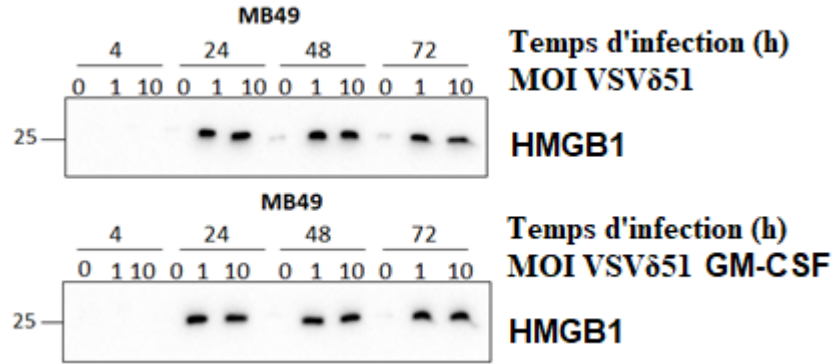


Figure 17 : Caractérisation de la présence du DAMP HMGB1 suite à une infection par VSV δ 51 et VSV δ 51 GM-CSF dans la lignée murine de cancer de la vessie : Immunobuvardages effectués à des temps variant de 4h à 72h dans trois conditions d'infection 0,1 et 10MOI. Les surnageants ont été prélevés pour déterminer la présence de la protéine dans les surnageants cellules cancéreuses de la vessie murine infectées. Les images d'immunobuvardage présentées sont représentatives de 3 expériences.

4.1.5 Caractérisation du relâchement d'ATP après infection des lignées cellulaires humaines de cancer de la vessie UMUC3 et 5637 par VSV δ 51

L'Adénosine triphosphate (ATP) fait également partie des DAMPs. La molécule médie une réponse immunitaire au niveau des cellules présentatrices d'antigène. En effet, l'ATP possède des propriétés chimio-attractantes et activatrices sur les cellules immunitaires⁵³. Ces propriétés font de cette molécule une bonne candidate pour contribuer au profil immunogénique d'une mort cellulaire. En effet, l'ATP extracellulaire agit surtout au niveau des récepteurs spécifiques des cellules présentatrices d'antigène, comme les cellules dendritiques⁵⁵ et les macrophages⁵³. Afin de caractériser le relâchement de l'ATP, nous avons mesuré l'ATP présente dans le surnageant de cultures cellulaires infectées à des temps allant de 4h à 72h et avec des concentrations de virus variant de 0, 1 et 10 MOI. Les mesures d'ATP ont été réalisées avec un luminomètre. La réaction implique la luciférine qui réagit avec l'ATP pour obtenir une émission lumineuse de 530nm. L'intensité de l'émission nous donne une mesure relative de la quantité d'ATP présente dans le surnageant au moment

de la prise de données. Pour les deux lignées cellulaires humaines de cancer de la vessie (Figure 18), on remarque que la quantité d'ATP augmente à partir de 12h pour ensuite atteindre son apogée à 24h. Les taux se rétablissent et se stabilisent ensuite à 48h. Ces résultats confirment le relâchement d'ATP induit par l'infection virale. La présence de la molécule supporte aussi l'hypothèse que VSV δ 51 est la cause d'une mort cellulaire immunogénique chez les cellules tumorales humaines.

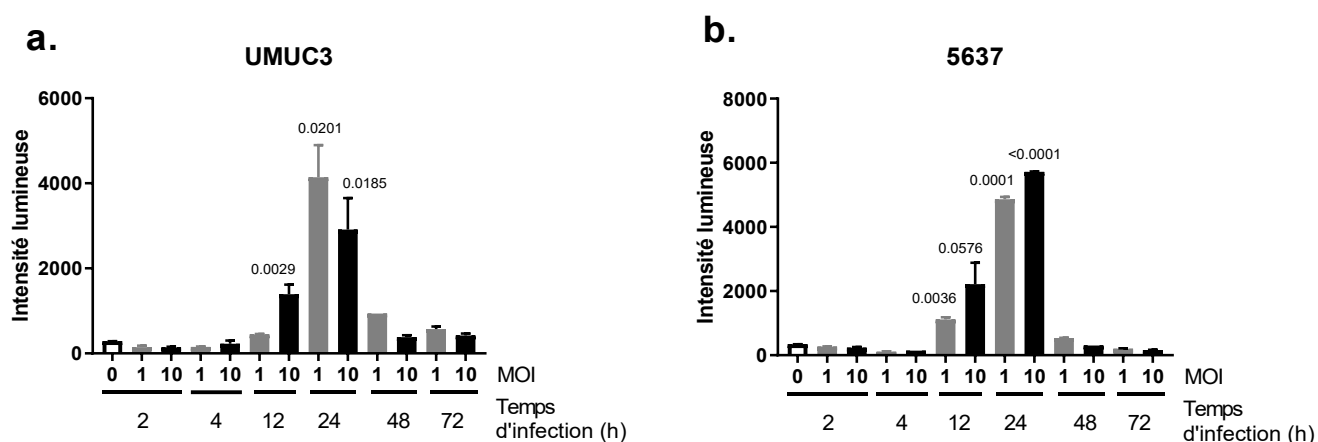


Figure 18 : Caractérisation de la présence d'ATP relâché suite à une infection par VSV δ 51 des cellules humaines de cancer de la vessie : a) Intensité lumineuse obtenue lors de la réaction de la luciférine avec l'ATP provenant du surnageant de UMUC3 infectées à des temps variant de 4 à 72h dans des conditions d'infection de 0,1 et 10 MOI. B) Intensité lumineuse obtenue lors de la réaction de la luciférine avec l'ATP provenant du surnageant de 5637 infectées à des temps variant de 4 à 72h dans des conditions d'infection de 0,1 et 10 MOI. En blanc la somme de toutes les conditions sans virus, en gris 1 MOI, en noir 10 MOI. Les statistiques proviennent de test T de student et les valeurs p sont indiquées au-dessus de chacune des conditions qui sont comparées au contrôle sans infection (0 MOI). Les figures sont représentatives de 3 expériences.

4.2 Caractérisation des effets des molécules relâchées sur les cellules immunitaires humaines.

4.2.1 Caractérisation des propriétés activatrices des molécules relâchées sur les monocytes humains.

Dans un premier temps, puisque la présence seule de DAMPs n'est pas garante d'une activité immunitaire, nous avons voulu caractériser les marqueurs de différenciation chez les monocytes humains en contact avec ces molécules. Effectivement, les monocytes sont des cellules présentatrices d'antigènes importantes dans la formation d'une réponse immunitaire adaptative. Le phénotype induit des monocytes peut être pro-inflammatoire et aider la réponse antitumorale. C'est pourquoi la détermination des marqueurs de différenciation est pertinente. Lorsque présent, le marqueur de différenciation CD80 est associé au phénotype M1, qui est à son tour associé à des fonctions pro-inflammatoires. Le CD163 est davantage associé au phénotype M2 qui est de nature anti-inflammatoire⁵⁹. Nos contrôles utilisés dans le cadre de cette expérience visent à incuber les monocytes avec des facteurs menant à une différenciation connue. Les M0 représentent les monocytes immatures et sont incubés avec du RPMI complet. Les M1 sont stimulés avec des lipopolysaccharides (LPS) et des IFN γ . Pour obtenir le phénotype M2, les cellules ont été incubées avec Il-4, Il-10 et le facteur de croissance transformant (TGF β *Transforming growth factor* β). Pour déterminer si les molécules relâchées par les cellules tumorales infectées peuvent induire la différenciation des monocytes, les cellules immunitaires ont été mises en culture avec les surnageants provenant de cultures infectées. Les monocytes ont ensuite été récoltés et les marqueurs présents à la surface des cellules ont été identifiés par cytométrie en flux. Nous avons pu observer que les monocytes ayant été incubés avec les surnageants de cellules infectées expriment davantage le marqueur CD80 (Figure 19) que les contrôles non-infectés. À

l'inverse, le marqueur CD163 (Figure 20) est exprimé de façon plus accrue chez les monocytes incubés avec des surnageants provenant de cellules non-infectées. Cet effet est notable chez les UMUC3 où le contrôle sans infection exprime CD163 contrairement aux conditions infectées. La présence de marqueurs appartenant à un phénotype pro-inflammatoire chez les monocytes en contact avec les DAMPs illustre l'impact de ces molécules sur le système immunitaire inné. En outre, le phénotype M1 suggéré par nos résultats, soutient l'éventuelle interaction des monocytes avec les lymphocytes effecteurs.

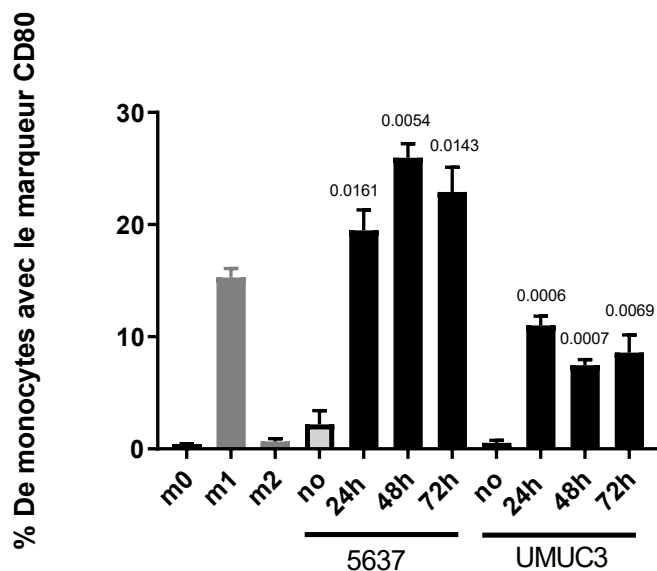


Figure 19 : Caractérisation de la différenciation des monocytes suite à une incubation de 24h avec du surnageant provenant de cellules humaines de cancer de la vessie infectées : Proportion de monocytes exprimant le marqueur de différenciation CD80 après stimulation avec le surnageant provenant de cultures infectées avec VSV δ 51 de UMUC3 et 5637. Les M0 représentent les monocytes immatures et sont incubés avec du RPMI complet. Les M1 sont stimulés avec des lipopolysaccharides (LPS) et des IFN γ . Pour obtenir le phénotype M2, les cellules ont été incubées avec Il-4, Il-10 et le facteur de croissance transformant (TGF β *Transforming growth factor* β). En blanc la condition sans infection; en noir, 10 MOI. Les statistiques proviennent de test T de student et les valeurs p sont indiquées au-dessus de chacune des conditions qui sont comparées au contrôle sans infection (0 MOI). La figure est représentative de trois expériences.

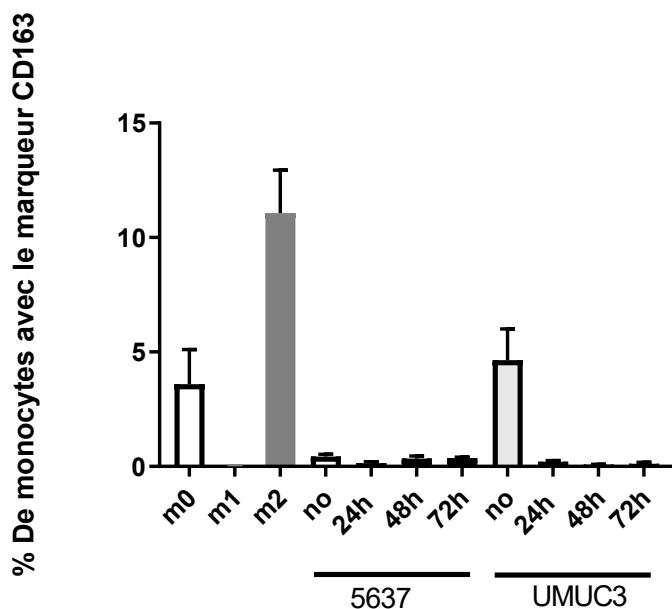


Figure 20 : Caractérisation de la différenciation des monocytes suite à une incubation de 24h avec du surnageant provenant de cellules humaines de cancer de la vessie infectées: Proportion de monocytes exprimant le marqueur de différenciation CD163 après stimulation avec le surnageant provenant de cultures infectées avec VSV δ 51 de UMUC3 et 5637. Les M0 représentent les monocytes immatures et sont incubés avec du RPMI complet. Les M1 sont stimulés avec des lipopolysaccharides (LPS) et des IFN γ . Pour obtenir le phénotype M2, les cellules ont été incubées avec Il-4, Il-10 et le facteur de croissance transformant (TGF β). En blanc, la condition sans infection; en noir, 10 MOI. Les statistiques proviennent de test T de student et les valeurs p sont indiquées au-dessus de chacune des conditions qui sont comparées au contrôle sans infection (0 MOI). La figure est représentative de 3 expériences.

4.2.2 Caractérisation des propriétés attractantes des molécules relâchées sur les lymphocytes effecteurs humains.

Dans un premier temps, une caractérisation des propriétés chimio-attractantes des molécules détectées au cours des expériences précédentes a été effectuée *in vitro*. Pour ce faire, un test de migration cellulaire a été réalisé. Cet essai vise principalement à déterminer si les molécules contenues dans le surnageant suite à une infection des cellules tumorales de la vessie peuvent induire la migration des cellules effectrices humaines. Les cellules visées

lors de cette expérience sont les lymphocytes T CD8⁺, les lymphocytes T CD4⁺ et les cellules NK. L'essai de migration est réalisé par le biais de la méthode suivante :

(1) Un compartiment détachable se divise en deux parties soit la partie fixe (chambre inférieure) et la partie vissée (chambre supérieure).

(2) Les chambres inférieures et supérieures sont séparées par une membrane semi-perméable permettant un transport unidirectionnel des cellules immunitaires. La chambre inférieure contient le surnageant de cellules infectées et la supérieure les cellules immunitaires.

(3) Le tout est laissé à température pièce pour une durée de 40 minutes après quoi le contenu de la chambre supérieure est aspiré et le contenu de la chambre inférieure est prélevé pour le décompte des cellules ainsi que le marquage.

(4) Les cellules contenues dans la chambre inférieure après l'étape de migration et de marquage sont ensuite analysées par cytométrie en flux pour caractériser les marqueurs d'intérêt.

L'établissement des proportions des différentes populations de cellules immunitaires combiné avec la quantité absolue de cellules présentes, nous indiquent la quantité totale des types cellulaires ayant migré sous la membrane. Les résultats obtenus par ce protocole montrent que chacun des types cellulaires (Figures 21 et 22) sont présents en quantité supérieure lorsque la migration est induite par du surnageant de cellules infectées. La migration accrue suggère que les DAMPs relâchés possèdent des propriétés attractantes sur les cellules effectrices, notamment les lymphocytes T CD4⁺, lymphocytes T CD8⁺ et les cellules NK. Nous avons utilisé, à titre de contrôle positif, la molécule attractante de monocytes (MCP-1 *Monocyte chemoattractant protein 1*). Cette molécule possède des

propriétés attractantes sur les monocytes et les lymphocytes⁶⁰. Nous avons effectué l'essai de migration avec une dose de 10 et 50ng de la molécule afin de pouvoir déterminer si la dose de molécule attractante a une incidence sur la quantité de cellules migrantes après la période d'incubation. Ainsi, nous avons remarqué que les cellules immunitaires exposées à des quantités de 50ng de MCP-1 migraient dans des quantités supérieures à celles exposées à 10ng.

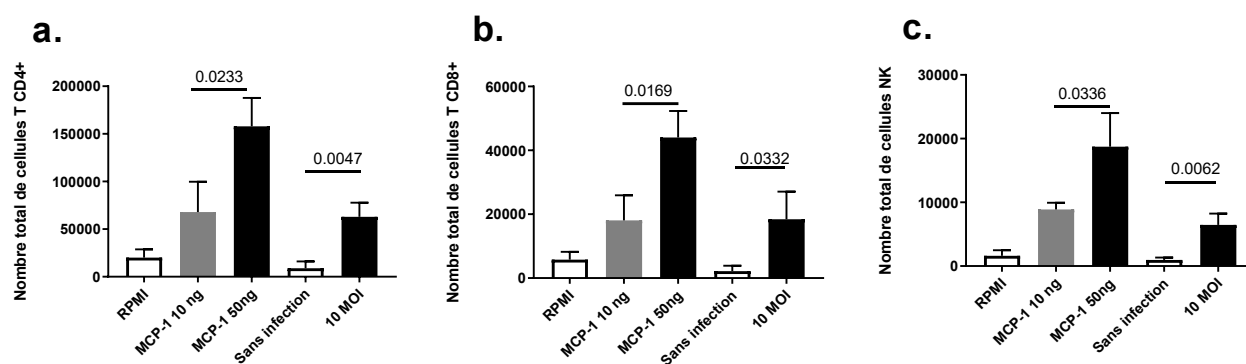


Figure 21 : Quantification des cellules effectrices migrantes après incubation avec le surnageant de cellules UMUC3 infectées: a) quantité absolue de lymphocytes T CD4 présente dans la chambre inférieure b) quantité absolue de lymphocytes T CD8 présent dans la chambre inférieure c) quantité absolue de cellules NK présentes dans la chambre inférieure. En blanc la condition sans infection, en noir 10 MOI. Les statistiques proviennent de test T de student et les valeurs p sont indiquées au-dessus de chacune des conditions qui sont comparées au contrôle sans infection (0 MOI). La figure est représentative de 3 expériences.

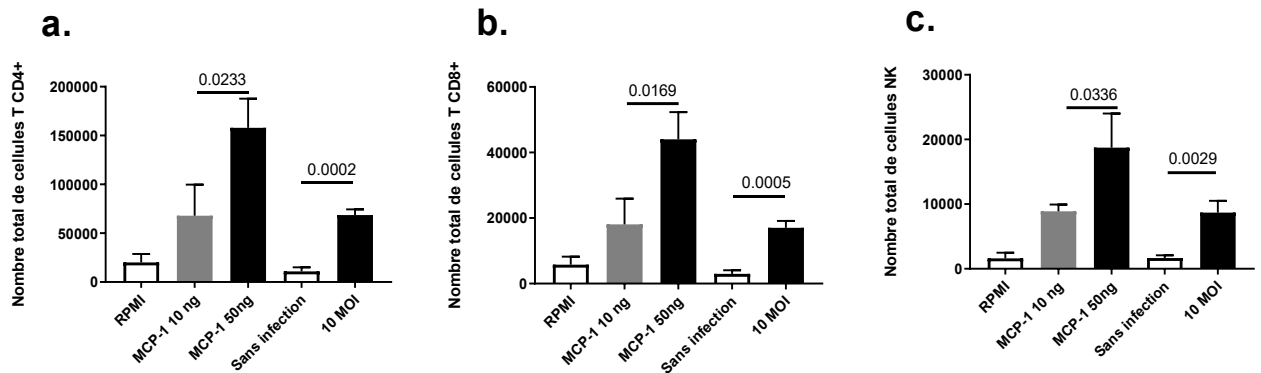


Figure 22 : Quantification des cellules effectrices migrantes après incubation avec le surnageant de cellules 5637 infectées: a) quantité absolue de lymphocytes T CD4 présente dans la chambre inférieure b) quantité absolue de lymphocytes T CD8 présents dans la chambre inférieure c) quantité absolue de cellules NK présentes dans la chambre inférieure. En blanc la condition sans infection, en noir 10 MOI. Les statistiques proviennent de test T de student et les valeurs p sont indiquées au-dessus de chacune des conditions qui sont comparées au contrôle sans infection (0 MOI). La figure est représentative de 3 expériences.

4.3 Caractérisation des ARNm exprimés par les cellules murines de cancer de la vessie suite à une infection par les virus VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF.

Pour déterminer le potentiel immunogène des cellules tumorales infectées par les virus VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF, nous avons identifié la présence de molécules clés bien établie dans la littérature. Le relâchement de ces molécules est d'ordinaire associé avec une réponse immunitaire accrue. Dans le but de poursuivre cette investigation, nous avons caractérisé d'ARNm pertinents associés à une réponse immunitaire subséquente. Ces molécules peuvent se diviser en trois catégories distinctes: les chimio-attractants, les récepteurs de surface pour la présentation d'antigènes et le facteur de croissance GM-CSF. Pour identifier les ARNm exprimés post-infection, nous avons infecté les cellules MB49

pendant 15h par les virus VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF après quoi les cellules sont récupérées. Ce point de temps particulier de 15h a été sélectionné puisque l'infection virale induit un stress avec une réponse rapide. La mesure des ARNm à un temps rapproché, nous a donc donné un portrait plus précis de la réponse, puisque ces molécules retournent rapidement à leur niveau de base⁶¹. La quantification elle-même a été réalisée par réaction de polymérase en chaîne (PCR) quantitative. Plus précisément, les ARNm étudiés sont le CCL2 et le CCL4 aussi appelée la protéine inflammatoire macrophagique 1b (MIP-1b), le CCL5, aussi appelée RANTES (chimio attractant pour cellules T), le CXCL10, aussi appelée la protéine IP-10, le CMH-I et finalement, le GM-CSF. Les résultats obtenus par cette méthode montrent que l'infection par le virus VSV δ 51-GM-CSF des cellules MB49 induit une augmentation de l'expression des ARNm liés à des molécules immunogènes (Figures 23 et 24) notamment, les H2-D1, H2K1, IP-10, MCP-1 et GM-CSF. Par contre, pour le virus VSV δ 51, la hausse des mêmes ARNm au sein des cellules infectées est présente mais n'est pas statistiquement significative.

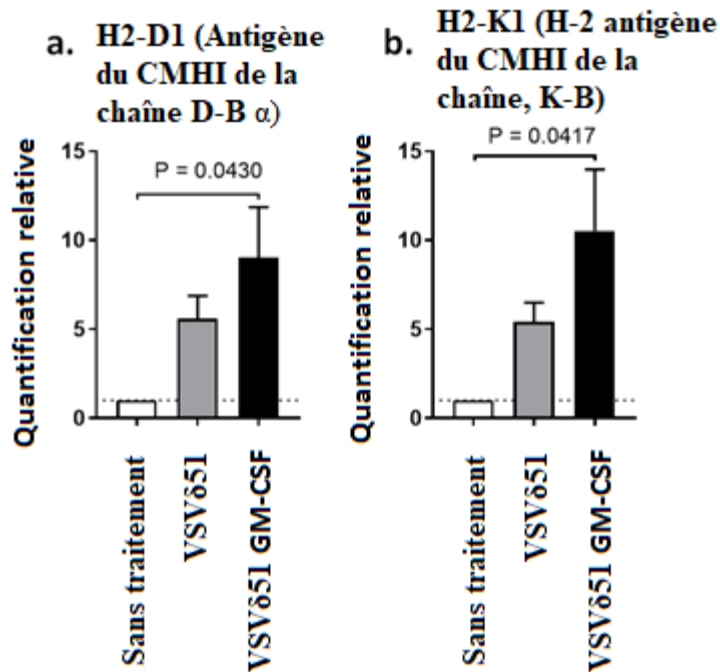


Figure 23 : Caractérisation de l'expression des molécules impliquées dans la présentation d'antigènes après infection de cellules MB49 pour une durée de 15h par VSV Δ 51 et VSV Δ 51 GM-CSF : a) Quantification relative des ARNm de H2-D1 du CMHI, b) Quantification relative des ARNm de H2-K1 du CMHI. Les tests statistiques sont des ANOVA et les figures sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

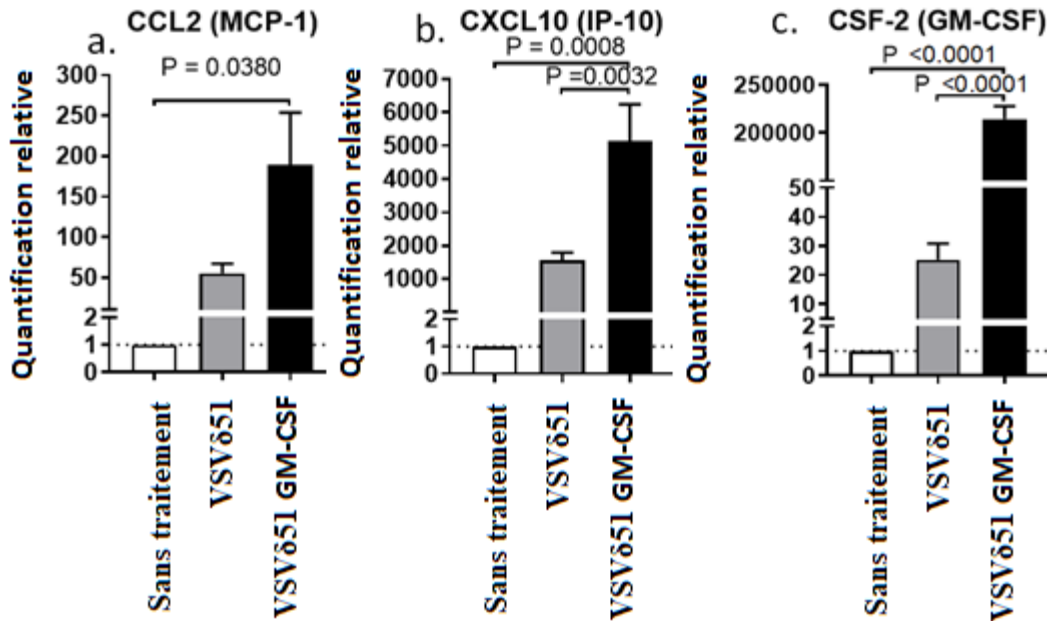


Figure 24 : Caractérisation de l'expression des molécules impliquées dans la présentation d'antigènes après infection de MB49 pour une durée de 15h par VSVδ51 et VSVδ51 GM-CSF : a) Quantification relative des ARNm de CCL2 ou MCP-1, un chimio-attractant, b) Quantification relative des ARNm de CXCL10 ou IP-10, un chimio-attractant, et c) Quantification relative des ARNm de CSF-2 (GM-CSF), un facteur de croissance. Les tests statistiques sont des ANOVA et les figures sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

4.4 Caractérisation par ELISA des protéines exprimées par les cellules murines de cancer de la vessie à la suite d'une infection par les virus VSVδ51 et VSVδ51 GM-CSF.

La quantification de l'expression des ARNm induite par l'infection des cellules MB49 par les VO VSVδ51 et VSVδ51-GM-CSF nous donne une idée générale sur les propriétés immunogènes dont font preuve les cellules tumorales infectées. En revanche, les ARNm et les protéines sont deux éléments liés, mais tout de même différents. Pour faire suite aux résultats obtenus par PCR quantitative où nous avons identifié une hausse de l'expression de gènes clés, nous avons voulu déterminer si les protéines étaient aussi sécrétées de façon accrue post-infection (Figures 25 et 26). Donc, pour arriver à cette fin, nous avons récupéré le surnageant provenant de l'infection employée pour la PCR quantitative. Le surnageant a été analysé par méthode de dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (ELISA) pour

détecter les protéines d'intérêt. Nous avons pu observer pour RANTES et IP-10 une forte augmentation de la quantité de ces protéines dans les surnageants de cellules infectées comparativement aux contrôles sans traitement. Cependant, ces niveaux étaient plus élevés du côté de VSV δ 51 que VSV δ 51-GM-CSF. Pour ce qui en est de l'expression de GM-CSF, cette dernière était fortement plus prononcée avec VSV δ 51-GM-CSF et comparable avec le contrôle non-infecté lorsque VSV δ 51 était en cause.

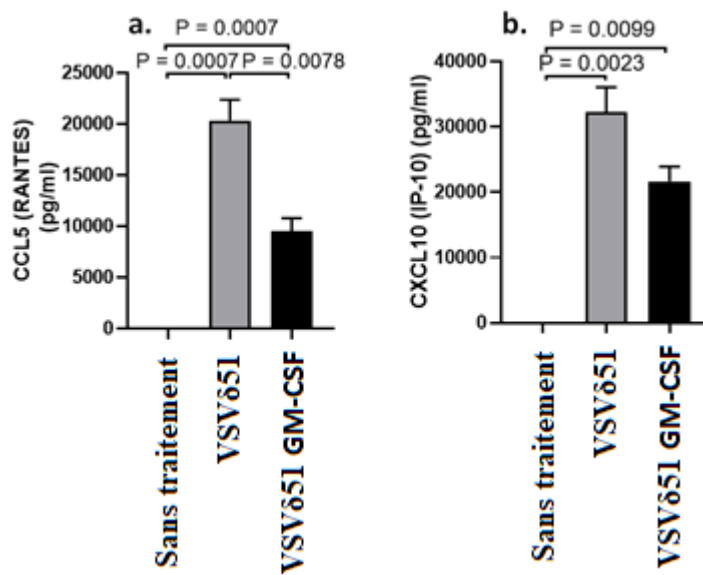


Figure 25 : Quantification de chimiokines exprimées après infection avec VSV δ 51 et VSV δ 51 GM-CSF : a) Quantification par ELISA de la protéine CCL5 (RANTES) dans le surnageant de cellules infectées de cellules MB49 infectées à 10 MOI avec VSV δ 51 et VSV δ 51 GM-CSF pendant 15h, b) Quantification par ELISA de la protéine CXCL10 (IP-10) dans le surnageant infecté de cellules MB49 infectées à 10 MOI avec VSV δ 51 et VSV δ 51 GM-CSF pendant 15h. Les tests statistiques sont des ANOVA et les figures sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

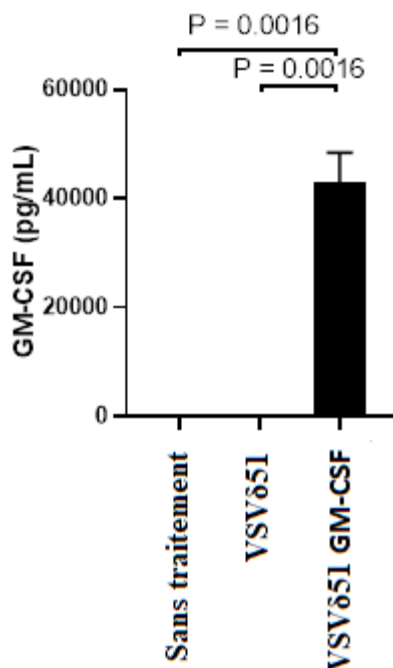


Figure 26 : Quantification du facteur de croissance GM-CSF exprimé après infection avec VSVδ51 et VSVδ51 GM-CSF : Quantification par ELISA du facteur de croissance GM-CSF dans le surnageant de cellules infectées de cellules MB49 infectées à 10 MOI avec VSVδ51 et VSVδ51 GM-CSF pendant 15h. Les tests statistiques sont des ANOVA et la figure est représentative de 3 expériences indépendantes.

4.5 Caractérisation *in vivo* en modèle syngénique des effets du traitement avec VSVδ51 et VSVδ51- GM-CSF sur les cellules immunitaires.

Les expériences *in vitro* effectuées jusqu'à présent avaient pour objectif principal d'établir le profil immunogénique de la mort cellulaire induite par VSVδ51 et VSVδ51 GM-CSF. Les résultats obtenus nous permettent de conclure que les virus mènent au relâchement de molécules ayant le potentiel d'alerter le système immunitaire. En revanche, les expériences employées ne peuvent contenir tous les éléments impliqués dans un organisme vivant. Pour démontrer l'hypothèse de la mort immunogénique, nous avons utilisé un modèle syngénique avec des souris C57Bl/6 femelles et une lignée cellulaire murine de cancer de la

vessie compatible, la MB49. L'implantation s'est faite de façon intravésicale avec une concentration de 1×10^6 de cellules MB49 dans des vessies préalablement traitées avec un mélange trypsine/EDTA dilué. L'étape de préparation de la vessie avec la trypsine nous a permis de former des microlésions dans l'organe, ce qui le prédispose favorablement à la prise de cellules tumorales. Les traitements (injection de virus) ont eu lieu 24h post-implantation et ont été répétés durant trois jours consécutifs. Les virus ont été administrés soit par injection intravésicale ou par injection intraveineuse. Le choix d'ajouter un traitement intraveineux avec VSV δ 51 nous donnait accès à une réponse immunitaire systémique rapide, offrant ainsi un point de comparaison viable avec les traitements intravésicaux. Le lendemain du régime de traitements, du sang a été prélevé des souris et analysé par cytométrie en flux pour caractériser les marqueurs d'activation exprimés par les cellules immunitaires d'intérêt. Cinq jours après la fin des traitements, les souris ont été euthanasiées et leurs rates ainsi que leurs vessies ont été extraites, pour ensuite être dissociées en des suspensions cellulaires. Ces suspensions cellulaires nous ont permis d'observer les cellules immunitaires autant au niveau local (vessie, uniquement au moment de l'euthanasie) qu'au niveau systémique (sang et rate) dans un contexte davantage relié à l'immunité adaptative. Les cellules qui ont attiré notre attention sont entre autres : les cellules NK, les cellules dendritiques conventionnelles (CD11c⁺) et les lymphocytes T CD8⁺. Du côté de l'immunité innée, la proportion relative des cellules NK (Figure 27) restait la même indépendamment des conditions de traitement. En revanche, ces mêmes cellules NK provenant de souris traitées soit avec le VSV δ 51 intraveineuse (IV) ou VSV δ 51-GM-CSF intravésical, démontraient un niveau d'expression de marqueurs d'activation précoces CD69 plus élevé que le contrôle PBS. Il en est également de même pour l'expression des IFN γ .

Cependant, l'expression de Granzyme B était accrue comparativement au contrôle chez les cellules NK provenant de souris traitées avec le VSV δ 51 IV. Pour leur part, toujours du côté de l'immunité innée, les cellules dendritiques conventionnelles sont aussi présentes dans les mêmes proportions indépendamment du traitement (Figure 28). De plus, on observe également que les cellules dendritiques systémiques expriment davantage les marqueurs de maturation CD80 et CD86. Les prélèvements finaux de la rate et la vessie sont représentatifs de l'immunité au niveau systémique et local. Nous avons étudié entre autres la présence des cellules NK et les lymphocytes T CD8⁺. Cinq jours post-traitement, les souris, ayant suivi les différents régimes de traitement, n'ont pas démontré de différence tant au niveau de la proportion des cellules qu'au niveau de l'expression des IFN γ et des CD69 au niveau systémique chez les cellules NK (Figure 29). Du côté des cellules effectrices de l'immunité adaptative (Figure 30), leur proportion, au niveau systémique, demeurait inchangée à travers les différentes conditions mais l'expression d'IFN γ augmentait lorsque l'animal avait reçu le VSV δ 51 IV ou le VSV δ 51-GM-CSF intravésical. Sur le plan des cellules effectrices infiltrantes (Figure 31), elles présentaient un niveau augmenté d'IFN γ lorsque les souris étaient traitées avec VSV δ 51-GM-CSF intravésical comparativement au VSV δ 51 mais n'était pas statistiquement significative en comparaison aux souris contrôles.

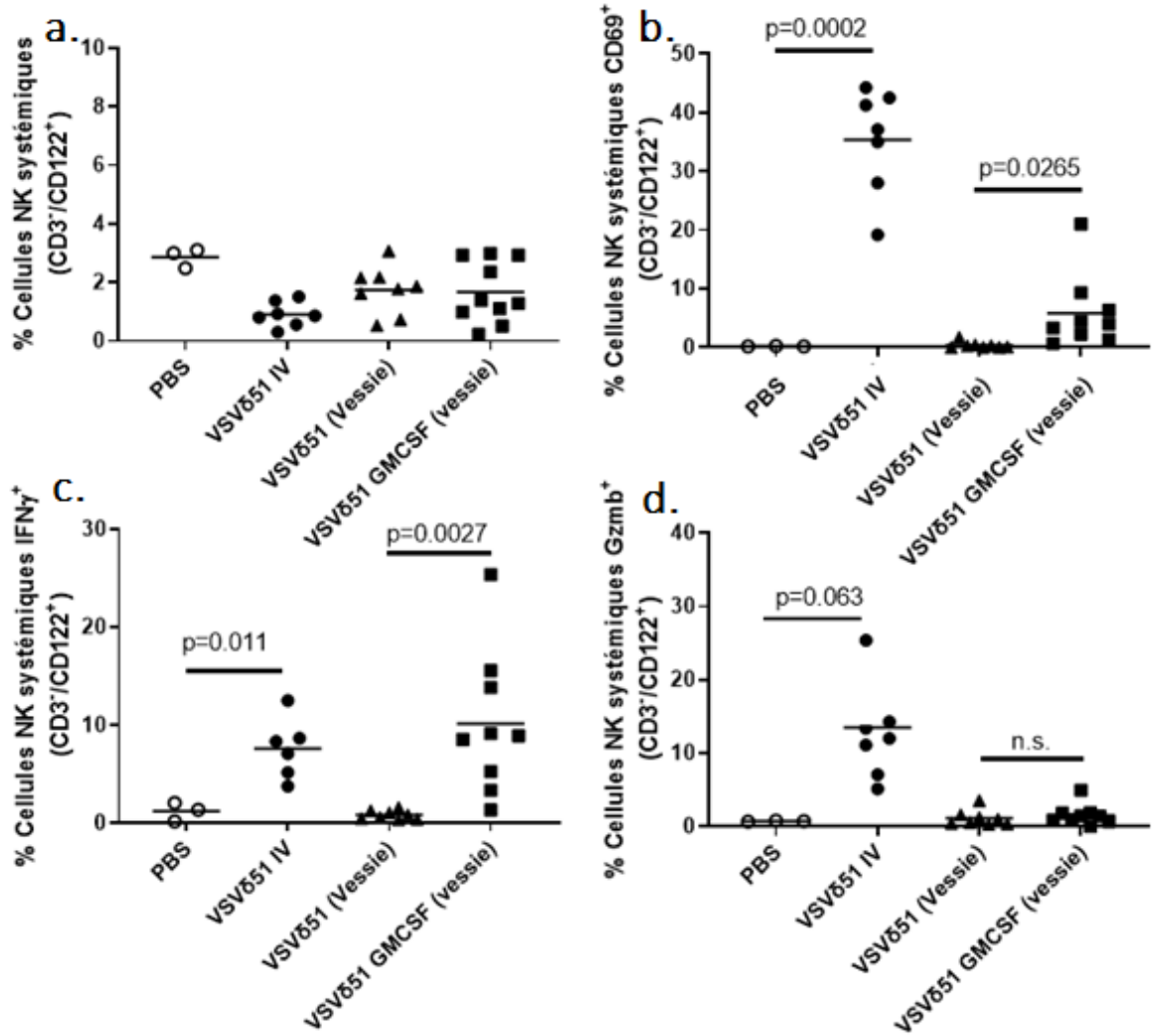


Figure 27 : Profil d'activation des cellules NK au niveau systémique suite aux traitements avec les virus oncolytiques VSV δ 51 et VSV δ 51 GM-CSF : a) 24h après les traitements avec les virus VSV δ 51 et VSV δ 51 GM-CSF administrés soit IV ou intravésical, des prélèvements sanguins ont été effectués sur les souris C57Bl/6 et analysés par cytométrie en flux pour déterminer la proportion relative des cellules NK au niveau systémique b) Proportion des cellules NK systémiques exprimant le marqueur d'activation précoce CD69 c) Proportion des cellules NK systémiques exprimant IFN γ d) Proportion des cellules NK systémiques exprimant Granzyme B. Les valeurs p proviennent d'un test t de student. Les figures sont représentatives de trois expériences. IV, intraveineuse.

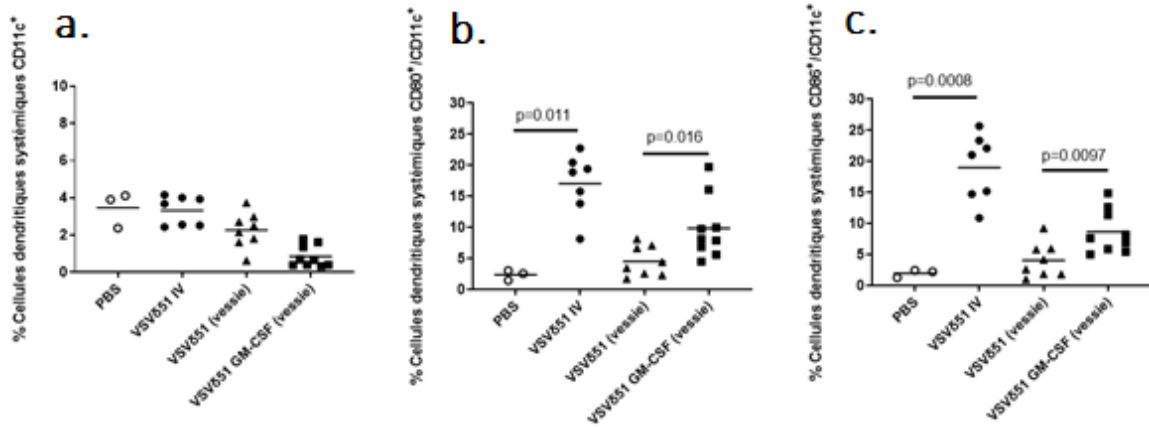


Figure 28 : Profil de maturation des cellules dendritiques conventionnelles au niveau systémique suite aux traitements avec les virus oncolytiques VSV δ 51 et VSV δ 51 GM-CSF : a) 24h après les traitements avec les virus VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF administré soit IV ou intravésical, des prélèvements sanguins ont été effectués sur les souris C57Bl/6 et analysés par cytométrie en flux pour déterminer la proportion relative des cellules dendritiques conventionnelles au niveau systémique, b) Proportion de cellules dendritiques conventionnelles exprimant le marqueur de maturation CD80, c) Proportion de cellules dendritiques conventionnelles exprimant le marqueur de maturation CD86. Les valeurs p proviennent d'un test t de student. Les figures sont représentatives de trois expériences. IV, intraveineuse.

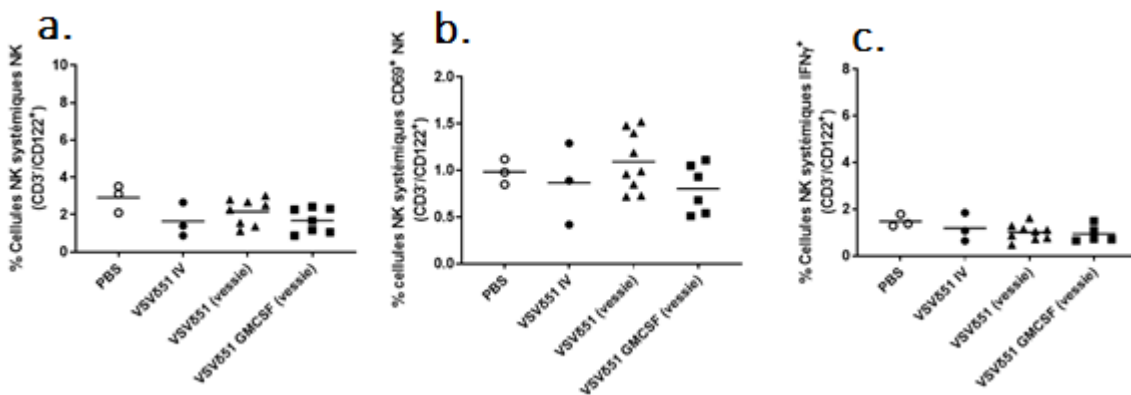


Figure 29 : Profil d'activation des cellules NK au niveau systémique suite aux traitements avec les virus oncolytiques VSV δ 51 et VSV δ 51 GM-CSF : a) 5 jours après les traitements avec les virus VSV δ 51 et VSV δ 51 GM-CSF administrés soit IV ou intravésical, la rate de souris C57BL/6 a été dissociée et analysée par cytométrie en flux pour déterminer la proportion relative des cellules NK au niveau systémique, b) Proportion des cellules NK systémiques exprimant le marqueur d'activation précoce CD69, c) Proportion des cellules NK systémiques exprimant IFN γ , d) Proportion des cellules NK systémiques exprimant Granzyme B. Les valeurs p proviennent d'un test t de student. Les figures sont représentatives de trois expériences. IV, intraveineuse.

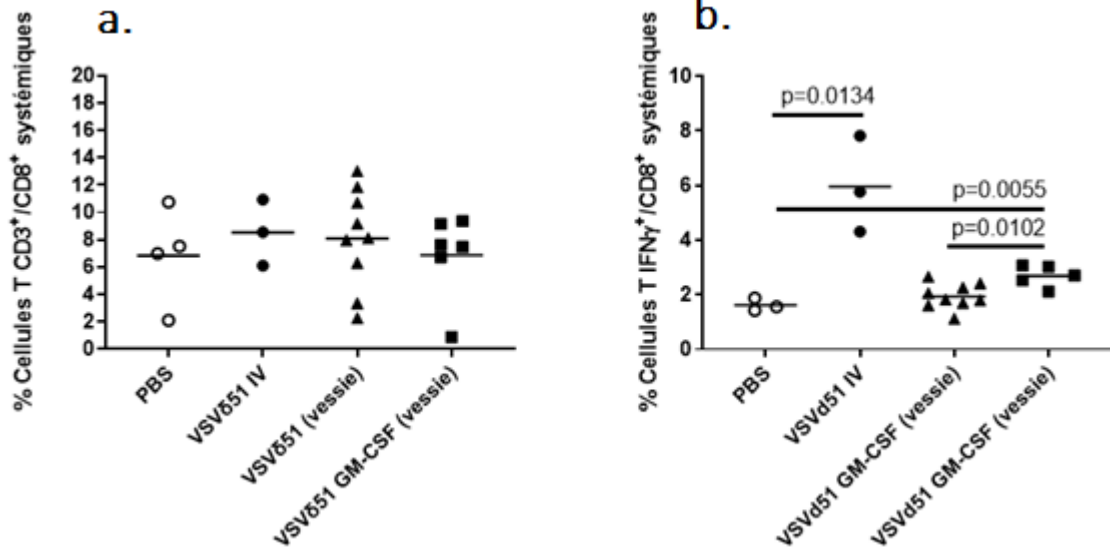


Figure 30 : Profil d'activation des lymphocyte T CD8⁺ au niveau systémique suite aux traitements avec les virus oncolytiques VSV δ 51 et VSV δ 51 GM-CSF : a) 5 jours après les traitements avec les virus VSV δ 51 et VSV δ 51 GM-CSF administrés soit IV ou intravésical, la rate de souris C57/bl6 a été dissociée et analysée par cytométrie en flux pour déterminer la proportion relative des cellules CD8⁺ au niveau systémique, b) Proportion des cellules CD8⁺ systémiques exprimant IFN γ . Les valeurs p proviennent d'un test t de student. Les figures sont représentatives de trois expériences. IV, intraveineuse.

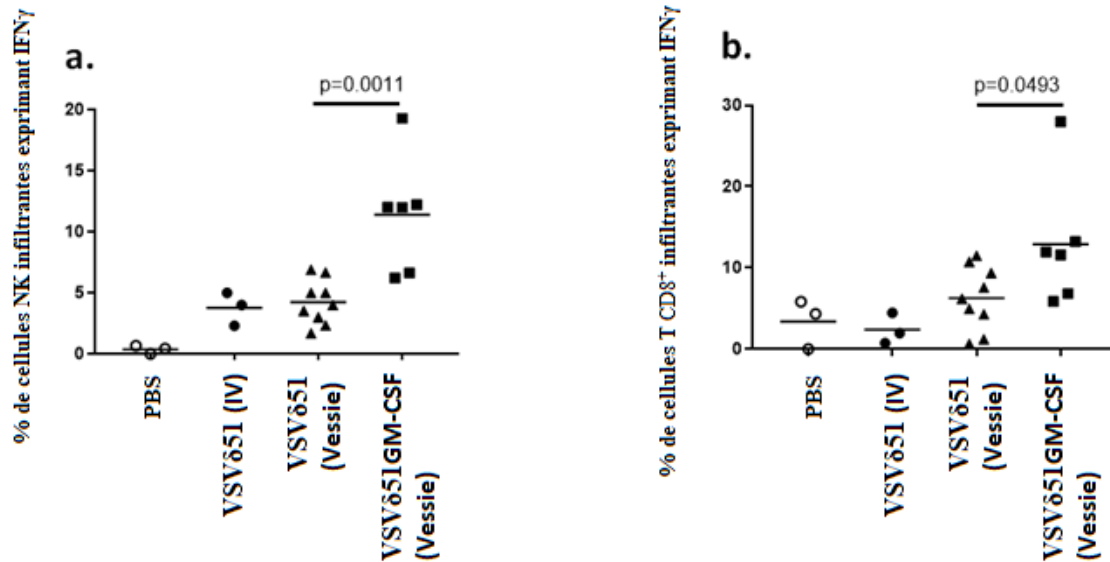


Figure 31 : Profil d'activation des lymphocyte T CD8 $^{+}$ et des cellules NK infiltrantes suite aux traitements avec les virus oncolytiques VSV δ 51 et VSV δ 51 GM-CSF : a) 5 jours après les traitements avec les virus VSV δ 51 et VSV δ 51 GM-CSF administrés soit IV ou intravésical, la vessie de souris C57Bl/6 a été dissociée en une suspension cellulaire et analysée par cytométrie en flux pour déterminer l'expression d'IFN γ et des cellules NK au niveau local b) Proportion des cellules T CD8 $^{+}$ infiltrantes exprimant l'IFN γ . Les valeurs p proviennent d'un test t de student. Les figures sont représentatives de trois expériences. IV, intraveineuse.

4.6 Caractérisation de l'implication des cellules immunitaires effectrices dans le fonctionnement du traitement avec le virus oncolytique VSV δ 51.

La caractérisation de l'état des cellules immunitaires post-traitement nous a donné des indications sur leur état d'activation. Cependant, nous avons voulu déterminer si cette activation, par elle-même, avait une incidence sur la survie des animaux traités. Pour ce faire, nous avons implanté une concentration de 1×10^6 cellules MB49 dans des souris C57Bl/6. Deux jours plus tard, nous avons effectué une déplétion pharmacologique à l'aide des anticorps prévus à cet effet. Les groupes de déplétion sont les lymphocytes T CD8 $^{+}$, les cellules NK ainsi que la combinaison des deux. Des prélèvements sanguins ont été fait dans le but de confirmer la déplétion des populations immunitaires visées (résultats non présentés

dans cet ouvrage). Ensuite, les animaux ont reçu le traitement avec VSV δ 51 administré par voie intraveineuse. Le choix de cette option nous a permis d'isoler le constituant immunitaire du traitement sans l'effet cytopathique ou vasculaire. Ceci a été fait dans le but de démontrer l'importance des cellules effectrices dans l'efficacité du traitement avec les agents infectieux. Une seconde déplétion a été effectuée après le premier traitement suivi d'un second traitement et d'une troisième déplétion. Nous avons choisi ce régime de déplétion en se basant sur un protocole déjà établi et fonctionnel⁶². Enfin, les souris ont été monitorées par échographie pour s'assurer de la présence de tumeur et afin de monitorer pour leur état de santé. Nous avons pu observer (Figure 32) que parmi les animaux traités, ceux qui n'ont pas eu de déplétions survivaient le plus longtemps. Les suivants étaient ceux avec une déplétion des cellules NK, suivi de la double déplétion lymphocytes T CD8⁺ et cellules NK, suivi de la déplétion unique des cellules NK suivi des contrôles sans traitement.

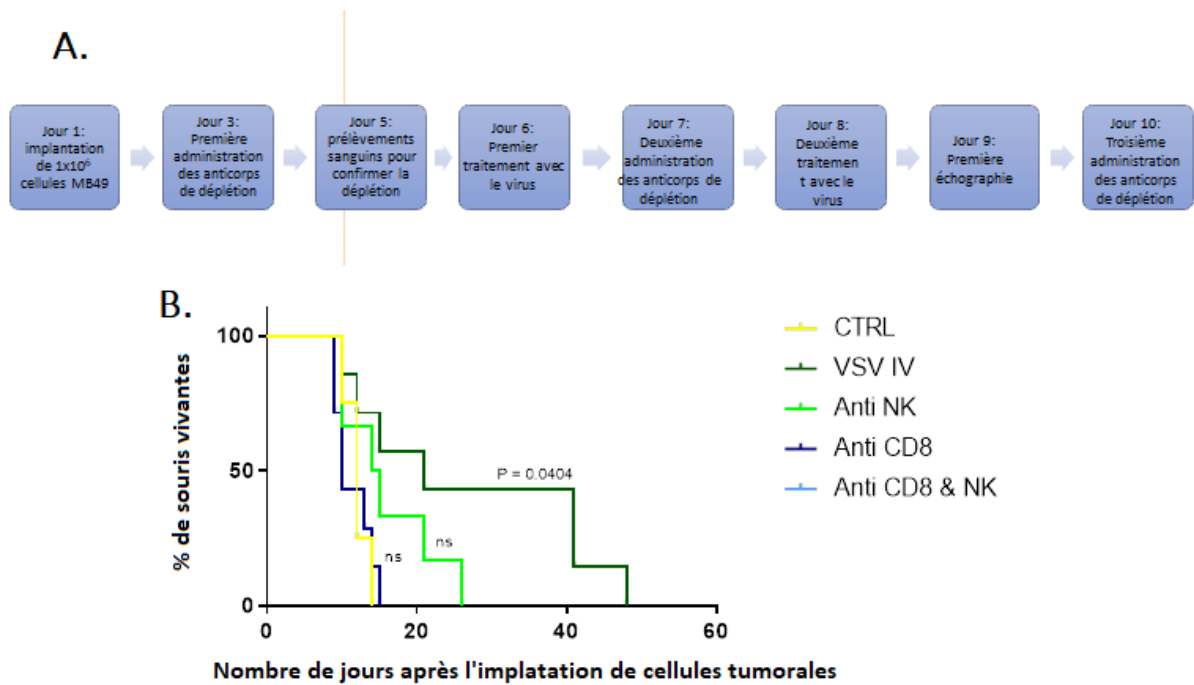


Figure 32 : Caractérisation de l'implication des cellules immunitaires effectrices dans le fonctionnement du traitement avec le virus oncolytique VSV δ 51 : A) Schéma présentant les différentes étapes impliquées dans l'expérience. B) Deux jours après implantation d'une concentration de 1×10^6 de MB49, les animaux (7 par groupe et 5 pour le groupe contrôle) ont été traités avec les anticorps de déplétion suivi deux jours plus tard du premier traitement viral administré par voie intraveineuse avec 5×10^8 PFU de VSV δ 51, suivi d'une deuxième déplétion et d'un second traitement. Une troisième et dernière déplétion a, par la suite, été effectuée. Les souris ont ensuite été monitorées et euthanasiées lorsque les conditions limites étaient atteintes. L'expérience a été réalisée une seule fois. Le groupe contrôle était composé de 5 souris et les autres groupes en avaient 7. Les valeurs p sont déterminées via une comparaison avec les contrôles non-traités en utilisant le test Log-Rank Mantel-Cox.

5. Discussion

5.1 Caractérisation de la mort cellulaire induite par les virus VSV δ 51 chez les lignées cellulaires humaines de cancer de la vessie et des virus VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF sur la lignée cellulaire murines de cancer de la vessie.

Les traitements immunothérapeutiques pour les cancers sont en plein essor. La compréhension des mécanismes immunitaires impliqués ainsi que les technologies permettant de mettre au point l'efficacité de ces agents d'immunothérapie sont de plus en plus exhaustives. Dans le cas du cancer de la vessie, l'immunothérapie courante pour prévenir la récurrence de la maladie est le BCG intravésical. Cependant, la majorité des patients abandonne leur traitement durant la période critique déterminante. Les raisons d'abandon sont variées et peuvent inclure la toxicité mais plus pertinemment un manque d'efficacité menant à la réapparition ou la progression de la maladie. C'est pourquoi nous avons proposé, comme alternative, un traitement pour le cancer de la vessie comprenant des éléments similaires, mais plus ciblés. La spécificité du traitement, pourra mener à une réponse antitumorale accrue. Entre autres, les VO nécessitent également le recrutement de cellules immunitaires effectrices pour un fonctionnement optimal. De plus, le relâchement des DAMPs se trouve aussi à être essentiel dans ce recrutement, cette propriété est partagée par le BCG et le VO. Dans ce projet, nous avons voulu déterminer si les VO VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF possèdent la capacité d'infecter les cellules tumorales de la vessie et d'induire l'expression de transgènes murins. Dans un même ordre d'idée, nous avons voulu déterminer si l'infection de lignées cellulaires de cancer de la vessie par les agents infectieux mène vers une mort cellulaire immunogénique. Pour parvenir à atteindre cette première série d'objectifs, nous avons d'abord infecté des cultures de cellules UMUC3, 5637 et MB49 avec des titres de virus de 0, 1 et 10 MOI et caractérisé la mort cellulaire sur plusieurs aspects. Les lignées cellulaires humaines ont été seulement infectées avec le virus parental VSV δ 51

puisque le transgène de GM-CSF contenu dans le virus VSV δ 51-GM-CSF code pour le facteur de croissance de souris. Or, les images obtenues par microscopie en fluorescence (Figure 8A et 9A) illustrent sur un plan plus large les effets cytopathiques de l'agent infectieux. La microscopie à champ clair a démontré que les conditions d'infection ont un impact négatif sur la densité des cellules UMUC3 et 5637. La perte de viabilité, corrèle avec les titres croissant de virus utilisés, confirme que le virus induit la mort cellulaire sur ces types de cellules. Dans un même ordre d'idée, nous avons aussi observé des changements morphologiques où les cellules sont devenues rondes et moins adhérentes. Les changements morphologiques supportent l'hypothèse de l'induction de la mort cellulaire médiée par les virus. Les images de microscopie en fluorescence prises sur les mêmes puits utilisés que celles à champ clair, nous renseignent sur l'expression du transgène GFP du virus parental au sein des cellules infectées. En comparant les images à champ clair à celles en fluorescence, il est possible d'observer une colocalisation des cellules avec les points fluorescents. La présence de GFP au sein des cellules infectées suggère que VSV δ 51 possède la capacité d'exprimer son transgène chez les cellules tumorales. Du côté des cellules de cancer de la vessie de souris, les MB49, nous avons pris des images dans les mêmes conditions avec les virus parental VSV δ 51 (Figure 10). La somme des résultats obtenus avec cette lignée nous donne des résultats très similaires à ceux des homologues humaines, ce qui suggère les mêmes conclusions. Également, les résultats démontrant l'expression du transgène viral dans la cellule murine mènent à l'hypothèse que VSV δ 51 GM-CSF possède aussi la capacité d'induire des effets cytopathiques dans les cellules murines de cancer de la vessie. Il est important de noter que le génome de VSV est petit soit de l'ordre de 11kb. Par conséquent, il n'est possible d'avoir qu'un seul transgène soit GFP ou GM-CSF⁴². Dans la même optique,

nous avons pris des images en microscopie électronique dans le but de caractériser la morphologie de la mort cellulaire induite par ces virus oncolytiques. Les images obtenues pour les lignées humaines (Figure 9B et 10B) mettent en premier plan les structures cellulaires endommagées lorsque les cellules sont infectées par des titres de virus de 10MOI. Chez les UMUC3 et 5637, nous avons remarqué l'absence d'organelles intactes, la fragmentation cellulaire et la formation de vésicules apoptotiques. En somme, la nature de ces dommages infligés aux cellules par VSV δ 51 suggère une mort cellulaire apoptotique. Nous avons également pris des images en microscopie électronique des MB49 infectées avec 10MOI des virus VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF. La comparaison entre les types de dommages obtenus avec les deux virus montre des différences au niveau des mécanismes de mort cellulaire. Les résultats d'infection avec le virus parental ressemblent davantage à ceux observés avec les cellules humaines. En effet, la fragmentation des structures cellulaires est observée avec VSV δ 51 alors que les dommages cellulaires sont moins organisés avec VSV δ 51-GM-CSF. Lorsque l'identité de l'agent infectieux est le VSV δ 51-GM-CSF, les débris cellulaires sont présents de façon moins compartimentée et la membrane plasmique est absente, ce qui suggère que le mécanisme de mort cellulaire correspond davantage à de la nécrose. En somme, les images obtenues par microscopie électronique illustrent grossièrement que la mort cellulaire induite par VSV δ 51 est apoptotique alors que celle induite par le VSV δ 51-GM-CSF est davantage nécrotique.

Dans un même ordre d'idée, nous avons voulu quantifier la diminution de la viabilité cellulaire induite par VSV δ 51 chez les lignées cellulaires du cancer de la vessie humaine. Nous avons utilisé comme temps de référence 72h avec des conditions d'infections croissantes (Figure 11). Les titres de virus pour les essais de viabilité cellulaire sont 0,

0.0001, 0.001, 0.01, 1 et 10 MOI. Le test MTT est colorimétrique et tire profit de l'activité mitochondriale. Le composé *3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide* (MTT) est converti en Formazan par les mitochondries⁶³. Le Formazan est détectable à une longueur d'onde de 540 à 720nm. Par conséquent, l'essai de viabilité cellulaire nous permet de quantifier la proportion de cellules vivantes selon leur métabolisme, ce qui se traduit, dans l'essai, par une forte détection de Formazan. Les résultats obtenus lors de l'infection des UMUC3 et 5637 correspondent à une diminution de la viabilité cellulaire corrélant inversement avec l'augmentation du titre de virus infectant. Cette corrélation semble se stabiliser à 0.1 MOI et la viabilité cellulaire reste la même indépendamment de l'augmentation du titre de virus. Puisque le temps d'infection reste fixe pour cette expérience, la stabilisation de viabilité cellulaire à 0.1MOI correspond au point où la majorité des cellules est morte. Ces résultats corroborent avec les figures précédentes démontrant quantitativement les effets cytotoxiques du virus VSV δ 51 sur les UMUC3 et 5637.

L'essai MTT avait aussi été effectué en utilisant les MB49. En revanche, cette expérience est une représentation du métabolisme mitochondrial des cellules. Ce qui rend l'expérimentation sur les cellules murines incomparable aux expériences sur les cellules humaines. Entre autres, les cellules MB49 en culture présentent un phénotype plus agressif que leurs homologues humaines. Cette différence au niveau de la croissance en culture rend les cellules murines plus susceptibles aux changements métaboliques en plus d'avoir une cinétique de mort cellulaire différente de celle retrouvée chez les UMUC3 et 5637. Pour ces raisons, les essais MTT effectués sur les MB49 sont imprécis et ne sont pas montrés dans cet ouvrage. Cependant, l'optimisation des paramètres de culture et d'infection est une

perspective d'avenir qui nous permettra d'illustrer quantitativement la mort cellulaire induite par les agents infectieux.

5.2 Caractérisation de la mort cellulaire induite par les virus par VSV δ 51 dans les lignées humaines de cancer de la vessie UMUC3 et 5637 et par VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF dans la lignée murine de cancer de la vessie MB49.

Pour déterminer avec plus de précision le type de mort cellulaire causé par les virus, nous avons voulu caractériser la présence de marqueurs spécifiques à l'apoptose et la nécrose dans un effort pour les discerner. Les trois marqueurs que nous avons employés pour faire la différence entre les types de mort cellulaire sont DAPI, Annexine V et calréticuline. L'Annexine V est un phospholipide normalement retrouvé en intracellulaire dans une cellule vivante. Cependant, durant l'apoptose, la membrane plasmique est inversée et l'Annexine V se retrouve dans l'environnement extracellulaire. La calréticuline lors de la nécrose se retrouve à la surface de la cellule suite à la fusion de la membrane du réticulum endoplasmique avec la membrane plasmique durant la nécrose⁵³. De plus, la calréticuline fait également parti des marqueurs bien établis de mort immunogénique et sa présence potentialise cette propriété⁵³. Enfin, DAPI est un marqueur de l'ADN qui nous permet de discriminer entre et l'apoptose, car la nécrose implique une disruption de la membrane plasmique alors que l'apoptose implique davantage une compartimentation cellulaire. Lors des expériences conduites sur les lignées cellulaires, nous avons utilisé, pour les lignées humaines UMUC3 (Figure 12) et 5637 (Figure 13), trois titres d'infection avec VSV δ 51 soit 0, 1 et 10 MOI aux temps de 4h, 24h, 48h et 72h. Nous avons pu observer que le phénotype de mort cellulaire apoptotique était majoritaire pour les deux types cellulaires. En effet, l'apoptose se présente aussi tôt que 24h et atteint son apogée à 48h pour ensuite diminuer au moment où le bassin de cellules pouvant présenter l'Annexine V se retrouve fortement

diminué. Or, la nécrose est présente de façon significative à partir de 24h et reste stable chez les deux lignées pour tous les temps successifs. Cependant, la cytotoxicité induite par VSV δ 51 gravite vers l'apoptose. Chez les lignées de cancer de la vessie de souris MB49, les virus VSV δ 51 (Figure 14) et VSV δ 51 GM-CSF (Figure 15) ont été utilisés dans les mêmes conditions et dans les mêmes temps que les lignées humaines. L'infection avec VSV δ 51 des lignées MB49 mène essentiellement aux mêmes conclusions que pour les lignées UMUC3 et 5637. Cependant, l'infection avec VSV δ 51-GM-CSF induit une mort cellulaire majoritairement nécrotique. En effet, l'exposition de la calréticuline débute après 4h d'infection et augmente avec les temps d'infection prolongés. En somme, l'infection avec VSV δ 51 mène vers une mort généralement apoptotique chez les trois lignées cellulaires utilisées lors de ce projet alors que VSV δ 51-GM-CSF provoque la nécrose chez les MB49. Il a été démontré que les interactions du facteur de croissance GM-CSF avec ses récepteurs (GM-CSFR) sur les cellules tumorales mènent à l'inhibition de l'apoptose⁶⁴. En outre, la molécule peut agir de façon autocrine ou paracrine et peut promouvoir la stimulation des cellules tumorales⁶⁴. Les conditions expérimentales employées permettent aux virus de se propager librement dans la culture et d'avoir un cycle lytique plus prononcé. Ce qui, combiné avec l'inhibition de l'apoptose, mène vers une mort majoritairement nécrotique. La prochaine étape sera de caractériser les autres composantes qui peuvent potentialiser le caractère immunogène de cette mort cellulaire.

5.3 Caractérisation de DAMPs relâchés post infection les lignées cellulaires de cancer de la vessie UMUC3, 5637 et MB49 par les VO VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF.

Avec pour objectif la confirmation du caractère immunogène de la mort cellulaire induite par les VO utilisés au cours du projet, nous avons caractérisé les DAMPs relâchés post-infection des cellules tumorales de la vessie. Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si la protéine HMGB1 était relâchée suite à la mort cellulaire induite par les virus. HMGB1 se retrouve dans les cellules saines et est une protéine nucléaire qui interagit avec les histones et l'ADN pour déterminer la structure de la chromatine⁶⁵. À l'extérieur de la cellule, la protéine interagit avec les cellules immunitaires par le biais de multiples récepteurs. Parmi ces récepteurs, on retrouve les TLR2, les TLR4, les TLR9 et les récepteur des produits terminaux de glycation (*RAGE receptors for advanced glycation end products*)⁶⁵. Plus précisément, l'interaction de HMGB1 avec les TLR4 des macrophages mène à l'expression de l'interleukine 6, une cytokine pléiotropique agissant sur la plupart des populations immunitaires. Donc, la présence de HMGB1 est un bon indicateur d'une mort immunogène puisque la protéine agit indirectement sur la majorité des populations immunitaires et est hautement inflammatoire. La méthode de détection employée pour détecter la molécule est l'immunobuvardage. Nous avons récolté les surnageants de trois différentes conditions d'infection qui sont 0, 1 et 10 MOI à plusieurs temps 4h, 24h, 48h et 72h. Les lignées humaines UMUC3 et 5637 infectées par VSV δ 51 (Figure 16) montrent la présence de la protéine HMGB1 dans les conditions infectées dès 24h. Chez la lignée murine de cancer de la vessie infectée avec VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF (Figure 17), nous avons également pu observer HMGB1 au temps de 24h et ce, avec les deux virus. La présence de la protéine pro-inflammatoire dans les surnageants de cellules infectées suggère que la mort cellulaire induite par les virus possède un potentiel immunogénique. Dans le cadre de cette expérience nous n'avons pas inclus de protéine contrôle puisque la caractérisation de la

protéine se faisait au niveau des surnageants. En effet, nous avons pour objectif de déterminer si HMGB1 était relâchée par les cellules infectées par les virus oncolytiques. Par conséquent, le contrôle utilisé pour faire la distinction est le surnageant de cellules non infectées qui permet de faire la différence entre les conditions d'infection.

Dans un second temps, nous avons voulu caractériser un autre DAMP important pour déterminer si la mort cellulaire possède un potentiel immunogénique qu'est l'ATP. Dans le cadre de cette expérience sur les lignées UMUC3 et 5637, nous avons conservé les mêmes conditions d'infections 0, 1 et 10MOI avec VSV δ 51 mais avec des temps plus rapprochés soit 2h, 4h, 12h, 24h, 48h et 72h (Figure 18). L'ATP est une molécule instable et sa détection nécessite une cinétique plus élaborée. Pour atteindre cet objectif de caractérisation, nous avons prélevé les surnageants de cellules infectées dans les conditions et temps décrits. Ces surnageants ont ensuite été soumis à une réaction avec la D-Luciférine menant à une émission lumineuse proportionnelle avec la quantité d'ATP présente. Les résultats montrent que l'ATP relâchée est détectable de façon significative après 12h d'infection et atteint son apogée à 24h pour ensuite retrouver son niveau initial à 48h. Ces résultats corroborent avec ceux obtenus précédemment, ce qui suggère que le virus VSV δ 51 induit une mort immunogénique chez les cellules tumorales de la vessie. Puisque nous avons déterminé le potentiel d'interaction des cellules lysées avec le système immunitaire, nous avons voulu investiguer les effets des molécules présentes sur la différenciation et l'activation des cellules immunitaires pertinentes

Ces expériences ont aussi été effectuées sur la lignée murine MB49. Par contre, pour des raisons liées aux conditions expérimentales, les manipulations sont sans résultats concluants. En effet, la lignée MB49 dans les mêmes conditions de culture que les lignées

humaines prolifère beaucoup plus rapidement que ses homologues humains. Cette distinction rend la mesure d'ATP aux temps requis et dans les mêmes conditions d'infection plus imprécise. En effet, la cinétique de mort cellulaire dans les mêmes conditions *in vitro* est différente et par extension, le relâchement de la molécule instable en est affecté également⁶⁶. De plus, le relâchement d'ATP est souvent associé à des changements métaboliques qui peuvent survenir lorsque la cellule est exposée à des conditions de stress non-spécifiques. Ces conditions peuvent être induites de différentes façons incluant les conditions de cultures employées pour obtenir les surnageants utilisés pour ces manipulations spécifiques.⁶⁷ Par conséquent, une perspective d'avenir consisterait en une optimisation des différents paramètres expérimentaux permettant d'obtenir des résultats consistants où le facteur déterminant le relâchement d'ATP est la présence du virus.

5.4 Caractérisation de la polarisation des monocytes humains après exposition aux surnageants provenant de cultures infectées par les virus oncolytiques.

Nous avons conclu, avec la caractérisation des DAMPs, que les molécules contenues dans le surnageant des cellules infectées ont un potentiel attractant sur les cellules immunitaires. L'états d'activation des cellules n'a pas été caractérisé. Donc, nous avons voulu caractériser la différenciation des monocytes suite à une exposition aux molécules relâchées par les cellules cancéreuses. Comme pour l'expérience précédente, nous avons récolté les surnageants de cultures cellulaires UMUC3 et 5637 infectées avec 0,1 et 10MOI de VSV δ 51 et exposées pendant 24h, 48h et 72h à l'agent infectieux. Des monocytes provenant d'un donneur sain ont ensuite été incubés avec ces surnageants à 37C pendant 24h. Cette solution a ensuite été marquée avec des anticorps pour permettre l'acquisition au

cytomètre en flux. Les marqueurs de surface auxquels nous avons porté un intérêt sont les CD80 et les CD163. CD80 est une molécule, exprimée à la surface des monocytes différenciés ou matures et est associée à un phénotype M1. Cette molécule a pour principal partenaire d'interaction le CD28, un récepteur situé sur les lymphocytes T CD8⁺. Elle représente aussi un élément crucial dans la costimulation des cellules effectrices. Cette costimulation favorise la destruction des cellules tumorales⁶⁸. CD163 est un récepteur éboueur responsable de l'élimination de l'hémoglobines/hépathoglobines⁶⁹. CD163 est généralement exprimée sur les monocytes présentant un phénotype anti-inflammatoire de type M2. Dans le cadre de l'immunité antitumorale, le phénotype M2 est synonyme d'expression des facteurs anti-inflammatoires. Lors de la réponse immunitaire induite par le virus du traitement, le phénotype M2 réduit la quantité de lymphocytes infiltrants et donc le bassin de cellules effectrice pouvant médier une activité cytolytique. L'effet anti-inflammatoire est aussi valable pour les cellules de l'immunité innée. Cet effet ralentit ainsi l'ensemble des processus immuns liés à l'immunité antitumorale. Inversement, le phénotype M1 est pro-inflammatoire et permet le recrutement plus efficace de cellules immunitaires innées et de TILs. Le phénotype M1 est donc plus favorable à l'immunité antitumorale. Nous avons choisi CD80 et CD163 pour caractériser les monocytes différenciés dans le but de confirmer le potentiel d'activation des cellules effectrices lymphocytaires et également pour confirmer leur phénotype pro-inflammatoire. Lorsque cultivés avec des surnageants de cellules infectées, les monocytes présentent une expression augmentée de CD80 (Figure 19). Aussi, on observe une expression inchangée de CD163 (Figure 20) dans les mêmes conditions. De plus, du côté des UMUC3, on remarque que les monocytes incubés avec les surnageants de cellules non-infectées expriment CD163 alors que les conditions infectées ne

l'expriment pas. Ces données suggèrent que les cellules cancéreuses sécrètent des facteurs anti-inflammatoires et que l'introduction du virus dans le micro-environnement tumoral peut réprimer ce phénotype chez les monocytes. Ces résultats illustrent le potentiel immunothérapeutique de VSV δ 51 qui peut aider à démarrer la réaction immunitaire ciblant les cellules tumorales au niveau des cellules présentatrices d'antigènes. En effet, les cellules immunitaires ont une présence accentuée au niveau du micro-environnement tumoral et présentent aussi un phénotype pro-inflammatoire prédisposé à activer les lymphocytes cytotoxiques.

En somme, l'ensemble moléculaire induit par l'infection possède le potentiel d'attirer les cellules immunitaires au site d'infection, en occurrence le site de la tumeur. De plus, ces molécules ont le potentiel d'activer les cellules effectrices menant ultérieurement à une réponse immunitaire dirigée contre les cellules cancéreuses.

5.5 Quantification de la migration des cellules immunitaires effectrices humaines.

Afin de caractériser les interactions entre les DAMPs et les cellules immunitaires, nous avons voulu déterminer si ces molécules ont des propriétés attractantes sur les cellules effectrices. Nous avons donc récupéré les surnageants de cultures de lignées cellulaires UMUC3 et 5637 infectées avec 10MOI de VSV δ 51 pendant 48h. Les types cellulaires étudiés sont les lymphocytes T CD8⁺, les lymphocytes T CD4⁺ et les cellules NK. Les cellules immunitaires ont été isolées à partir d'un donneur humain sain. Les résultats de l'essai par puits superposés démontrent que les surnageants provenant de cultures infectées induisent la migration des cellules effectrices. Lorsque la condition sans virus est utilisée, nous avons pu remarquer que pour les lignées cellulaires UMUC3 (Figure 21) et 5637 (Figure 22), la quantité absolue de cellules lymphocytaires dans partie inférieure du montage

est similaire à celle du contrôle négatif RPMI. En revanche, nous avons pu observer une différence significative entre la condition avec virus et le contrôle provenant d'une culture non-infectée. Lorsque 10 MOI de VSV δ 51 sont utilisés pour obtenir le surnageant, le nombre de cellules migrantes est similaire à celui du contrôle positif où nous avons employé 10ng de la protéine chimio attractante de monocytes (MCP-1). MCP-1 ou CCL2 est une chimiokine qui possède des propriétés attractantes sur plusieurs types cellulaires incluant les monocytes et les cellules lymphocytaires⁶⁰. La cytokine est sécrétée par les monocytes, macrophage et même les cellules endothéliales et attire les cellules cibles vers les concentrations croissantes⁶⁰. Nous avons eu recours à MCP-1 à titre de contrôle positif puisqu'elle possède un rôle chimio-attractant sur un nombre important de cellules immunitaires. La présence des cellules immunitaires dans le compartiment contenant le surnageant de cellules infectées suggère que les molécules relâchées par les cellules tumorales infectées ont des propriétés attractantes sur ces dernières. Or, ces résultats suggèrent que VSV δ 51, en infectant les cellules tumorales induit le relâchement de DAMPs, induisant ensuite une hausse de la population des lymphocytes infiltrants capable de monter une réponse immunitaire ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses.

5.6 Caractérisation des ARNm induits par l'infection de cellules murines de cancer de la vessie par les virus VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF.

Dans le but de caractériser davantage les effets de l'infection virale sur les cellules tumorales de la vessie, nous avons quantifié les ARNm de plusieurs facteurs immunogéniques dans des cellules MB49 infectées avec VSV δ 51 et VSV δ 51 GM-CSF

pendant 15h. Après ce temps d'infection, les cellules ont été récoltées dans du trizol et les ARNm de ces cellules ont été extraits pour ensuite être rétrotranscrits en ADN et quantifiés par PCR quantitative. Nous avons étudié trois catégories d'ARNm reliées à des protéines d'intérêt. Ces catégories sont le CMHI, les cytokines chimioattractantes et les facteurs de croissance. Les molécules du CMH I sélectionnées sont H2-D1 et H2-K1. Ces molécules présentes à la surface des cellules cancéreuses témoignent de leur potentiel à être ciblées et éliminées par les lymphocytes T cytotoxiques. C'est pourquoi nous les avons prises en considération. Les cellules MB49 infectées pendant 15h avec un titre de 10MOI de VSV δ 51 et VSV δ 51 GM-CSF (Figure 23) présentaient une transcription intensifiée d'ARNm de H2-D1 et H2-K1. Une tendance ou cet effet était plus prononcé avec l'infection au VSV δ 51-GM-CSF peut être observé même si elle n'est pas statistiquement significative. L'augmentation de la transcription de ces deux ARNm est une indication du potentiel de ciblage des cellules tumorales par les populations lymphocytaires cytotoxiques. De surcroit, la différence entre les deux virus, si elle devenait statistiquement significative, supporterait l'hypothèse que VSV δ 51-GM-CSF possède un caractère immunogénique accentué en comparaison avec le virus VSV δ 51. Cette observation est en accord avec la démonstration que la liaison du GM-CSF avec son récepteur sur les cellules cancéreuses mène à une expression accrue de plusieurs molécules dont celles du CMHI⁶⁴.

Les ARNm sélectionnés pour les cytokines sont MCP-1, RANTES, IP-10 et GM-CSF. MCP-1 tel que décrit précédemment est une cytokine chimioattractante pour les lymphocytes et macrophages. RANTES est aussi une cytokine chimioattractante pour les lymphocytes T et possède un rôle dans la prolifération et activation des cellules NK⁷⁰. La protéine IP-10 est une cytokine dont l'expression est stimulée par les cellules activées par

les IFN γ ⁷¹. Plusieurs types cellulaires peuvent sécréter IP-10 dont les monocytes et les cellules endothéliales. Le rôle de la cytokine se définit surtout selon ses propriétés attractantes pour macrophages, les lymphocytes T et cellules NK en plus de son implication dans l'adhésion des cellules immunitaires aux cellules endothéliales. En outre, l'adhésion des cellules effectrices a pour effet de promouvoir l'activité antitumorale. GM-CSF tel que décrit dans l'introduction est un facteur de croissance avec une activité activatrice directe et indirecte sur un large spectre de cellules immunitaires. Les résultats obtenus pour la catégorie des cytokines (Figure 24) sont similaires à ceux obtenus pour les molécules du CMH1 dans le sens où une forte hausse de transcription de IP-10 peut être observée avec un effet plus prononcé pour le VSV δ 51-GM-CSF. Dans le cas de MCP-1, les résultats suggèrent la même conclusion même si la tendance n'est pas statistiquement significative. Ces résultats corroborent la littérature puisqu'il a été démontré que l'interaction de GM-CSF avec les cellules tumorales peut induire un phénotype antigénique chez les cellules cibles⁶⁴. Enfin, pour le facteur de croissance GM-CSF (Figure 25), nous avons pu remarquer que similairement les cellules infectées avec le VSV δ 51 avaient une expression accrue. En contrepartie, VSV δ 51-GM-CSF induit une transcription 5000 fois plus élevée de GM-CSF que son homologue VSV δ 51. Cette différence était attendue puisque VSV δ 51-GM-CSF contient le transgène correspondant, ce qui nous confirmait que le génome du virus est bien transcrit. La hausse de la présence des ARNm provenant des cytokines et des GM-CSF au sein des cellules MB49 infectées suggère le rôle immunogénique des virus VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF. En résumé, les cellules tumorales infectées expriment des facteurs inflammatoires et les molécules du CMH1 plus fortement, ce qui les rendent plus vulnérables à l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD⁸⁺ et cellules NK.

5.7 Caractérisation des protéines induites par l'infection de cellules murines de cancer de la vessie murine par les virus VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF

La caractérisation des ARNm associés des facteurs immunogéniques pertinents au sein des cellules MB49 infectées par VSV δ 51 et VSV δ 51 GM-CSF, nous a suggéré que les protéines associées sont présentes en quantité supérieure post-infection. Nous avons récolté le surnageant de ces cultures pour quantifier les facteurs immunogéniques par ELISA. Nous avons sélectionné les analyses en fonction des résultats obtenus de la quantification des ARNm. Par conséquent, MCP-1, IP-10, RANTES et GM-CSF sont les candidats que nous avons quantifiés. Cette caractérisation nous a donné des indications supplémentaires à la quantification des ARNm. En effet, en comparant les quantités de cytokines pro-inflammatoires dans les surnageants de cellules infectées et non-infectés (Figure 25). Nous avons pu remarquer une hausse de la présence de ces molécules dans les surnageant provenant de cultures infectées. Cependant, nous n'avons pas trouvé de différence d'expression des cytokines et chimiokines mesurées en comparant les deux virus. D'ailleurs, l'expression de RANTES par les cellules infectées par VSV δ 51 est même plus élevée que celle retrouvée chez les cellules infectées par VSV δ 51-GM-CSF. Ces résultats contredisent ceux obtenus de la quantification des ARNm présent dans les mêmes cellules. Nous expliquons cette disparité par les raisons suivantes. Puisque l'expression protéique est un processus plus lent que celle des ARNm, nous pouvons en déduire que la somme des étapes menant à l'expression ont une cinétique différente avec une infection par le VSV δ 51-GM-CSF. Également, il est possible que GM-CSF puisse interférer avec la sécrétion des facteurs immunogéniques. En outre, pour élucider cette différence, il serait intéressant comme perspective d'effectuer les analyses à différents temps afin d'établir une cinétique d'expression et de transcription. La quantification du contenu intracellulaire est aussi une

avenue à explorer puisque nos analyses ne tiennent compte que du contenu extracellulaire. Somme toutes, ces résultats contribuent à démontrer le potentiel immunogénique des cellules tumorales atteintes par les VO. Par ailleurs, les résultats de quantification du facteur de croissance GM-CSF (Figure 26) indiquent une sécrétion accrue de la protéine uniquement chez les MB49 infectées par VSV δ 51-GM-CSF. D'une part, ce résultat confirme l'expression du transgène du virus mutant. D'autre part, l'absence d'une différence de sécrétion de GM-CSF entre les cellules non-infectées et celles infectées par VSV δ 51 contredit les résultats obtenus avec les ARNm correspondants. Encore une fois, établir une cinétique de transcription accompagnée d'une étude du contenu intracellulaire pourrait permettre d'élucider la disparité des résultats. En résumé, les analyses des surnageants cellulaires par ELISA confirment la sécrétion de protéines pro-inflammatoires post-infection des cellules tumorales murines par VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF. Ces résultats renforcent l'hypothèse du caractère immunogénique des VO suite à leur introduction dans les cellules cancéreuses. La prochaine étape nous mène vers l'utilisation de modèle murin où les agents infectieux peuvent être testés thérapeutiquement.

5.8 Caractérisation *in vivo* des effets du traitement avec VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF sur les cellules immunitaires dans un modèle syngénique murin de cancer de la vessie.

Les expériences *in vitro* effectuées jusqu'à présent suggèrent que les virus VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF ont des propriétés oncolytiques chez les cellules murines de cancer de la vessie. En effet, la mort cellulaire a été caractérisée par microscopie et par cytométrie en flux. De plus, nous avons caractérisé la présence accrue de plusieurs facteurs immunogéniques tels que HMGB1, MCP-1 et GM-CSF. Nous avons donc établi un modèle

orthotopique syngénique de cancer de la vessie à partir des cellules MB49 implantées de façon orthotopiques dans des souris C57Bl/6. Ce modèle de souris immunocompétente nous a permis d'identifier les conséquences de l'utilisation de VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF en tant qu'agent permettant l'activation du système immunitaire. D'abord, nous avons implanté les tumeurs de façon intravésicale. Ensuite, pour émuler les conditions de traitement utilisées dans un contexte clinique où les traitements immunothérapeutiques sont effectués sur des tumeurs résiduelles après résection. Nous avons traité avec les virus deux jours après implantation quand les tumeurs sont de petites tailles et correspondent à 0 à 2% du volume total de la vessie. Dans des expériences préliminaires dont les résultats ne sont pas présentés dans cet ouvrage, la méthode d'implantation décrite précédemment a été réalisée avec un taux de succès de 100%. Dans cet ordre d'idée, le succès d'implantation des MB49 chez les souris C57Bl/6 est de l'ordre de 95% dans la littérature⁷². La certitude élevée du succès de la procédure d'implantation nous a permis de procéder avec ce régime de traitement. Des prélèvements sanguins ont été faits au premier jour post-traitement pour caractériser les récepteurs d'activation des populations immunitaires innées ainsi que leurs proportions relatives. Pour ce qui en est des cellules NK (Figure 27), leur population systémique relative ne diffère pas selon les différents traitements donnés. En revanche, la proportion de cellules NK exprimant IFN γ , et CD69 augmente avec le traitement avec le VSV δ 51-GM-CSF intravésical. Cette hausse est aussi présente avec VSV δ 51 administré de façon intraveineuse mais pas intravésicale. Cette hausse de proportion de cellules NK activées est en accord avec les résultats de nos expériences *in vitro* qui ont démontré la présence de molécules activatrices de cette population telles que IP-10 et RANTES. Au prélèvement du jour 1 post-traitement, nous avons aussi étudié les cellules dendritiques conventionnelles (Figure 28).

La proportion de ces cellules restait inchangée indépendamment des traitements donnés. En contrepartie, la proportion de cette population exprimant le CD80 augmentait de façon significative avec les traitements de VSV δ 51 IV et de VSV δ 51-GM-CSF intravésicaux. Les populations de cellules NK et dendritiques conventionnelles systémiques activées par les traitements VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF IV et intravésicaux, respectivement, suggèrent que les virus ont une interaction avec ces cellules immunitaires. Autrement dit, dans un contexte d'immunité précoce, le traitement VSV δ 51-GM-CSF administré localement mène à une activation précoce systémique des cellules de l'immunité innée. La différence entre les virus parental et recombinant administrés localement supporte l'hypothèse du caractère immunogénique plus prononcé de VSV δ 51 GM-CSF ainsi que celle de l'induction d'un micro-environnement tumoral immunogénique.

Au jour 5, les vessies et les rates des animaux ont été prélevées afin de les dissocier en une suspension cellulaire pour les analyses par cytométrie en flux. La vessie dissociée nous donne une représentation des populations lymphocytaires situées dans la tumeur puisque la digestion enzymatique de l'organe est complète et non-discriminative. La rate est un organe lymphoïde important et joue un rôle majeur dans l'éducation des populations de lymphocytes contre des pathogènes spécifiques. Dans le cadre de cette étude nous avons utilisé la rate comme une représentation systémique puisque l'organe reflète globalement l'état d'activation des cellules immunitaires effectrices. Les analyses ont porté notre attention sur les cellules NK et les lymphocytes T CD8⁺. Nous avons remarqué que dans la rate, les cellules NK (Figure 29) présentaient des proportions ainsi qu'une expression inchangée de CD69 et d'IFN γ indifféremment des traitements effectués sur les animaux. En revanche, toujours au niveau systémique, les populations de lymphocytes T CD8⁺ (Figure 30), malgré

leur population inchangée avec les traitements, présentaient une expression augmentée, comparativement aux souris du groupe contrôle, d'IFN γ avec les VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF intraveineux et intravésicaux, respectivement. La réponse systémique centrée sur les lymphocytes T CD8⁺ suggère que la réponse immunitaire post traitement à long terme est surtout médiée par les cellules effectrices de l'immunité adaptative.

Du côté des cellules immunitaires situées au sein de la tumeur ou dans la vessie (Figure 31), les cellules NK et les lymphocytes T CD8⁺ montraient une expression d'IFN γ plus élevée après traitement avec le VSV δ 51-GM-CSF par voie intravésicale que les contrôles traités avec le PBS. Cette augmentation n'était pas présente lorsque le traitement était effectué avec le VSV δ 51 administré soit de façon intraveineuse ou intravésicale. Ce résultat nous confirme en modèle murin que le virus VSV δ 51-GM-CSF possède la capacité de médier une réponse immunitaire adaptative au niveau du micro-environnement tumoral. Dans leur ensemble, les résultats *in vivo* donnent une représentation globale de l'interaction entre le système immunitaire et les cellules tumorales lysées par le virus. Initialement, nous avons observé des marqueurs d'activation des cellules lymphocytaires systémique de l'immunité innée ainsi qu'une différenciation des monocytes et des cellules dendritiques en un phénotype pro-inflammatoire. Au jour cinq, nous avons observé que localement, les lymphocytes de l'immunité adaptative ainsi que des cellules NK exprimaient des marqueurs d'activation. Le traitement intravésical avec le VSV δ 51-GM-CSF nous a permis d'obtenir ces résultats et présentait une différence significative avec les souris non traitées. Ces résultats vont dans le sens de l'hypothèse où le virus recombinant est plus adapté à induire un micro-environnement immunogénique.

Nous avons démontré *in vitro* que le virus recombinant VSV δ 51-GM-CSF était capable d'exprimer son transgène au sein des cellules tumorales. Il est possible que le facteur de croissance étant présent au sein du micro-environnement tumoral permet le recrutement plus rapide des cellules présentatrices d'antigène au site d'infection. En parallèle, les DAMPs ainsi que l'ensemble des molécules dont le relâchement est induit par l'activité lytique du virus contribuent à entraîner une réaction immunitaire. Suite à leur activation, les cellules de l'immunité innée peuvent migrer vers les nœuds lymphatiques et les organes lymphoïdes secondaires pour présenter les antigènes phagocytés aux cellules effectrices. Les cellules effectrices migrent à leur tour au site d'infection et peuvent exercer leurs propriétés cytotoxiques sur les cellules tumorales.

En somme, ce modèle offre des éléments d'explication du rôle immunitaire dans le fonctionnement du traitement avec un virus oncolytique. Notamment, retrouve l'activation précoce des cellules de l'immunité innée au niveau systémique et la présence locale et systémique des lymphocytes effecteurs au point de temps tardif. Ces deux éléments suggèrent que les cellules effectrices ont des contributions différentes durant la période post-traitement. Les cellules de l'immunité innée sont plus actives au temps précoce et celles de l'immunité au temps tardif. Les résultats obtenus ne peuvent confirmer avec certitude le mécanisme de fonctionnement des deux virus. Or, de façon générale, le virus recombinant induit une réponse immunitaire plus forte. La présence accrue de GM-CSF dans l'environnement général de la tumeur étant le principal facteur de distinction des deux virus, cela suggère que GM-CSF accélère le recrutement des cellules immunitaires infiltrantes. La prochaine étape sera de confirmer l'utilité de cette réaction immunitaire pour l'obtention

d'un pronostic positif où la croissance tumorale est ralentie et les souris atteignent leur point limite plus tard.

5.9 Caractérisation de l'implication des cellules immunitaires effectrices dans le traitement avec le virus oncolytique VSV δ 51.

Les expériences *in vivo* nous ont suggéré le potentiel immunitaire de l'activité thérapeutique des virus VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF. C'est pourquoi nous avons décidé d'effectuer une expérience ciblant spécifiquement la dimension immunitaire du traitement. Nous avons donc déplété pharmacologiquement les populations immunes effectrices et nous avons administré le VSV δ 51 en IV de façon concomitante dans le but d'établir le suivi de la survie des souris ayant subi un traitement (Figure 32). Les souris ayant reçu les cellules tumorales mais aucun traitement, ont été les premières à atteindre leur point limite après 12 à 14 jours. Le terme point limite représente ici le point limite fixé par le comité institutionnel de protection des animaux (CIPA) où les animaux présentent une perte de poids importante ou des signes de souffrance importants. Les souris dont les lymphocytes T CD8⁺ ont été déplétés ont suivi aux alentours du jour 16. Les souris ayant reçu l'anticorps de déplétion des cellules NK et une double déplétion des cellules NK et cellules CD8⁺ T ont atteint leur point limite au jour 22 et 26, respectivement. Les animaux ayant eu la durée de vie la plus longue ont été ceux dont le système immunitaire était intact. Ces résultats suggèrent que les cellules effectrices jouent un rôle important dans l'efficacité du traitement avec le VSV δ 51. Notamment, les souris ayant reçu les anticorps de déplétion atteignent le point limite à des temps similaires aux groupes homologues avec un système immunitaire intact. Ce qui exclue ainsi la possibilité de toxicité de la déplétion. Autrement dit, le facteur déterminant le pronostic post-traitement est le système immunitaire. En ce sens, la réponse immunitaire est médiée par les cellules NK et les lymphocytes T CD8⁺ mais avec un biais envers l'immunité

adaptative, c'est-à-dire les lymphocytes T CD8⁺. En effet, la déplétion des cellules T CD8⁺ menait vers un pronostic presque identique à celui des souris sans traitement.

En résumé, la déplétion des cellules immunitaires illustre l'importance des cellules effectrices autant innées qu'adaptatives puisque leur présence favorise la survie des animaux traités comparativement aux contrôles qui n'ont reçu aucun traitement.

6. Conclusions et perspectives

Pour conclure, mon projet avait pour objectif global de déterminer le potentiel des VO VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF en tant qu'agents immunothérapeutiques pour le cancer de la vessie non-invasif. Pour arriver à atteindre cet objectif, nous avons eu recours à trois lignées cellulaires, les UMUC3, les 5637 et les MB49. De ces lignées, les deux premières proviennent de carcinomes humains et la troisième d'un carcinome murin. Ce projet étudie les interactions entre trois éléments qui sont les cellules tumorales, les VO et les cellules

immunitaires. La première partie du projet consistait à caractériser les effets cytopathiques des virus sur les lignées cellulaires. Nous avons d'abord établi que les virus étaient en mesure d'infecter les cellules tumorales et de mener à leur destruction. Cette démonstration s'est faite, entre autres, par imageries au microscope à fluorescence et au microscope électronique. Puis, elle a été confirmée chez les cellules humaines par un essai de viabilité. Pour développer davantage ce concept, nous avons également caractérisé la présence post-infection de plusieurs facteurs marquant une mort immunogénique. Ceux chez les cellules humaines étaient l'HMGB1, l'ATP et la calréticuline tandis que chez les cellules murines, nous avons caractérisé par PCR quantitative les ARNm correspondant à MCP-1, IP-10, RANTES et GM-CSF. L'expression de ces facteurs a été confirmée par un ELISA dans les surnageants cellulaires récoltés de la même infection. La deuxième partie du projet nous menait à étudier les effets de la mort cellulaire induite par les virus sur des sous-populations de cellules immunitaires clés. Chez les cellules humaines, nous avons effectué des expériences *in vitro* pour séparer et étudier les éléments d'une réaction immunitaire. Dans un premier temps, nous avons comparé la différenciation des monocytes incubés avec les molécules relâchées par les cellules tumorales de la vessie infectées. Dans un second temps, nous avons fait un essai de migration pour confirmer les propriétés chimio-attractantes de ces molécules. Nous avons observé, lors de cette expérience, une présence accrue de CD80 chez les monocytes, ces récepteurs sont importants dans l'activation des cellules effectrices de l'immunité adaptative. Ceci nous confirmait le potentiel d'une réponse ciblant les cellules tumorales initiée par VSV δ 51. Du côté des MB49, nous avons établi un modèle syngénique orthotopique qui nous permettait de tester nos hypothèses *in vivo*. Après l'administration intravésicale du VSV δ 51-GM-CSF, nous avons observé la présence systémique précoce de

cellules NK exprimant IFN γ et CD69. Cet état immunitaire n'était pas observé avec le virus parental, ce qui supporte l'hypothèse du caractère immunogénique plus prononcé chez le virus recombinant. Les analyses tardives prises au jour 5 au niveau local et systémique allaient aussi dans ce sens. En effet, nous avons remarqué que les lymphocytes T CD8⁺ expriment l'IFN γ à la fois systémiquement et localement, ce qui suggère qu'une réponse immunitaire avait lieu au niveau du micro-environnement tumoral. Encore une fois, cet effet a aussi été observé avec le VSV δ 51-GM-CSF administré localement. Enfin, nous avons démontré que les cellules immunitaires effectrices jouaient un rôle majeur dans l'efficacité du traitement avec les VO. La somme de ces résultats suggère que VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF ont des réels potentiels en tant qu'agents thérapeutiques pour traiter les patients atteints d'un cancer de la vessie non-invasif.

Les directions futures que peuvent prendre ce projet sont diverses. Dans l'immédiat, pour compléter notre modèle présent, nous pourrions évaluer l'impact des traitements avec VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF sur la survie et la croissance tumorale. En plus d'imager la vessie, les échographies peuvent être utilisées afin de prendre des séries d'images. Ces séries peuvent être compilées dans un logiciel spécialisé afin de reconstituer une image tri-dimensionnelle de la vessie. À partir de cette reconstitution, nous pourrions mesurer avec précision la taille de la tumeur à différent moment post-traitement et ainsi déterminer l'impact du traitement sur le volume tumoral. En parallèle, nous pourrions surveiller l'état de santé des animaux traités ce qui nous donnera des indications sur le pronostic possible des patients traités avec les VO. À plus long terme, nous avons établi au cours de ce projet une biobanque constituée de cellules tumorales de patients atteints de NMIBC opérés au Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (CHUS). De plus, nous avons aussi isolé les cellules

immunitaires du sang de ces mêmes patients. Cette biobanque pourra être utilisée pour établir un modèle murin humanisé orthotopique de cancer de la vessie. Traditionnellement, le modèle couramment utilisé pour étudier les cellules tumorales consiste à observer ces cellules en culture⁷³. Cependant, l'environnement *in vitro* n'offre pas des conditions représentatives du micro-environnement retrouvé dans une tumeur typique. En effet, il n'est pas possible de reproduire en culture la complexité de l'expression génique ainsi que le schéma complexe d'interaction entre les cellules tumorales et avec son micro-environnement⁷³. Alors, ces méthodes rendent impossible la reproduction fidèle de l'hétérogénéité des cellules d'une tumeur d'un patient dans ces conditions non-optimales⁷³. Alors, un modèle de souris humanisé est une bonne alternative puisqu'il offre des conditions d'étude se rapprochant de la réalité clinique. Le modèle de souris dérivé d'une xéno greffe de patient (PDX *Patient Derived Xenograft*) consiste en la greffe, soit orthotopique ou hétérotopique, d'une tumeur d'origine humaine dans une souris immunodéficiente⁷³. Le modèle orthotopique, malgré sa plus grande complexité de réalisation, offre une représentation plus fidèle de la maladie⁷³. Le principal avantage du modèle de souris humanisé se trouve dans son micro-environnement plus similaire à celui retrouvé chez l'humain. Cela permet d'observer chez les générations tumorales subséquentes un comportement plus près de celui retrouvé chez la lignée parentale. Cependant, il s'agit d'un modèle coûteux qui requiert une expertise plus pointue pour sa maintenance. C'est d'ailleurs une des raisons pourquoi le modèle n'est pas utilisé plus fréquemment⁷³. Enfin, ce modèle a aussi pour désavantage une période de latence des cellules cancéreuses suite à leur transplantation⁷³. Dans le but d'humaniser les modèles animaux, il est nécessaire de prendre en considération la réaction du système immunitaire qui ne permet pas l'ajout de tissus

étrangers dans des conditions normales. Par conséquent, l'utilisation de souris qui sont dépourvues de défense contre les xéngreffes s'avère à être un outil intéressant puisque cela permet d'ignorer la réaction de l'hôte contre le greffon. Plus précisément, ce projet pourrait utiliser des souris triplement immunodéficientes. Ces souris ont été génétiquement modifiées par le système CRISPR-Cas9 pour altérer les gènes *Prkdc* et *Il2rg*⁷⁴. Les gènes affectés ont un rôle important dans les processus de maturation des cellules immunitaires des lignées lymphoïdes, neutralisant par le fait même les lymphocytes T, B et les cellules NK. Il s'agit des piliers de la réponse immunitaire adaptative. En combinant l'ajout de cellules immunitaires et la greffe orthotopique de cellules tumorales, le modèle humanisé de souris recrée avec davantage de fidélité les conditions physiologiques retrouvées cliniquement. La combinaison de ces deux xéngreffes représente donc un moyen d'étudier les traitements immunothérapeutiques. En soi, l'opportunité d'étudier les interactions entre les cellules immunitaires d'un patient spécifique et sa propre tumeur représente un objectif que le modèle de souris humanisée peut atteindre. En dépit de ses avantages, le modèle reconstitué de la souris triplement immunodéficiente n'est pas sans défaut. Un des inconvénients principaux de ce modèle se situe dans la maladie du greffon (*graft vs. Host disease*). Cette maladie est secondaire à la reconnaissance des cellules de l'hôte par les cellules immunitaires implantées comme un corps étranger. Les cellules immunitaires greffées entraînent ensuite une réponse contre les cellules de l'hôte, ce qui mène vers son décès. En effet, des expériences pilotes, effectuées dans notre laboratoire, ont démontré que des souris dont le système immunitaire est reconstitué développaient la maladie du greffon contre l'hôte après 45 jours, ce qui semblerait nous donner suffisamment de temps pour évaluer un traitement. Toujours dans un effort d'obtenir un modèle humain représentatif des conditions cliniques, nous avons aussi

comme perspective d'avenir d'établir un modèle de culture organoïde à partir des cellules immunitaires et tumorales obtenues de patients volontaires. Les organoïdes sont essentiellement des cultures tridimensionnelles obtenues à l'aide d'un milieu de culture contenant du matrigel et des facteurs hormonaux spécifiques au développement des cellules cancéreuses. Le développement des cellules dans ce milieu permet la conservation de l'hétérogénéité tumorale ce qui donne un portrait plus fidèle des conditions de traitement que le modèle de culture traditionnel⁷⁵. L'intégration de la composante immune est aussi une possibilité offerte par ce modèle. Sommairement, en ajoutant le virus directement aux cultures organoïdes nous pourrions étudier directement les effets cytolytiques. L'appariement des cellules immunitaires avec les tumeurs de patients nous donne aussi l'opportunité de développer davantage le modèle en trois dimensions *in vitro*. La technologie d'un système micro-fluidique permet de contrôler différents paramètres du micro-environnement tumoral⁷⁶. Cette approche pourra enrichir l'étude *in vitro* du cancer de la vessie en ajoutant la composante immunitaire. Nous avons démontré dans cet ouvrage le potentiel adjuvant des VO VSV δ 51 et VSV δ 51-GM-CSF. Cette thérapie a le potentiel de traiter les patients suite aux interventions chirurgicales liées au cancer de la vessie et peut contribuer à renforcer l'immunité antitumorale, ce qui aurait pour effet de favoriser la survie des patients traités.

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mes directeurs de recherche Dr Lee-Hwa Tai et Dr Patrick Richard qui ont été tout au long de mon parcours des mentors d'exception. Ils ont su m'épauler et m'aider à surmonter les défis que représentent la maîtrise en immunologie. Merci à Dr Richard qui s'est dévoué pour rendre ce projet possible et qui m'a permis d'avoir cette expérience clinique qui reste un point marquant pour moi.

Je tiens aussi à remercier tous les membres de l'équipe. Christine Lawson notre professionnelle de recherche, qui non-seulement a été essentielle sur le point de vue

scientifique et humain a été d'un grand support tout au long de mon parcours. Je remercie également Seyedeh-Raheleh Niavarani pour son professionnalisme et sa rigueur et pour le partage de sa riche expérience de vie. Samuel Rouleau pour son calme et sa présence réconfortante ainsi que son mentorat scientifique indispensable et Marie Boudeaud dont l'expertise et les talents de communicatrice ont contribué à mon développement.

Finalement, je tiens à remercier ma famille qui m'a supportée et encouragée tout au long de ce parcours. Ma mère Suzanne Bernier, mon père Marc Godon, mon frère Sébastien Bernier et mon neveu Loyk Bernier-Levasseur. Un merci spécial à monoureuse Joannie Gélina qui partage ma vie qui a été une source de réconfort durant les moments difficiles et source de joie à chacun de mes retours à Montréal.

Références

1. Canadian Cancer Society. No TCanadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics Read more: <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/bladder/statistics/?region=on#ixzz5XyGYmlgwitl>. *Canadian Cancer Statistics 2017* (2017).
2. Brierley, J. D., Gospodarowicz, M. K. & Wittekind, C. TNM classification of malignant tumours - 8th edition. *Union Int. Cancer Control* 272 (2017).
doi:10.1002/ejoc.201200111
3. Lamm, D. *et al.* Incidence and treatment of complications of bacillus Calmette-

- Guerin intravesical therapy in superficial bladder cancer. *The Journal of urology* **147**, 596–600 (1992).
4. Kobayashi, T. *et al.* Modeling bladder cancer in mice: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer* **15**, 42–54 (2015).
 5. Canada, S. Statistiques canadiennes sur le cancer. *Cancer* (2013).
 6. Santos, F., Dragomir, A., Zakaria, A. S., Kassouf, W. & Aprikian, A. Health-care services utilization and costs associated with radical cystectomy for bladder cancer: A descriptive population-based study in the province of Quebec, Canada. *BMC Health Serv. Res.* **15**, (2015).
 7. Sexton, W. J. *et al.* Bladder cancer: a review of non-muscle invasive disease. *Cancer Control* **17**, 256–268 (2010).
 8. Dobruch, J. *et al.* Gender and Bladder Cancer: A Collaborative Review of Etiology, Biology, and Outcomes. *Eur. Urol.* **69**, 300–310 (2016).
 9. Malats, N. & Real, F. X. Epidemiology of Bladder Cancer. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **29**, 177–189 (2015).
 10. Pasin, E., Josephson, D. Y., Mitra, A. P., Cote, R. J. & Stein, J. P. Superficial bladder cancer: an update on etiology, molecular development, classification, and natural history. *Rev. Urol.* **10**, 31–43 (2008).
 11. Babjuk, M. *et al.* EAU Guidelines on Non–Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *Eur. Urol.* **71**, 447–461 (2017).
 12. Potts, K. G., Hitt, M. M. & Moore, R. B. Oncolytic viruses in the treatment of

- bladder cancer. *Adv. Urol.* **2012**, (2012).
13. Knowles, M. A. & Hurst, C. D. Molecular biology of bladder cancer: New insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 25–41 (2015).
 14. Kamat, A. M., Ba??c??o??lu, M. & Huri, E. What is new in non-muscle-invasive bladder cancer in 2016. *Turk Urol. Derg.* **43**, 9–13 (2017).
 15. Oosterlinck, W. *et al.* Should All Patients Receive an Immediate Chemotherapeutic Drug Instillation After Resection of Papillary Bladder Tumors ? **59**, 374–376 (2011).
 16. Redelman-Sidi, G., Glickman, M. S. & Bochner, B. H. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer-A current perspective. *Nat. Rev. Urol.* **11**, 153–162 (2014).
 17. Kamat, A. M. *et al.* BCG-unresponsive non-muscle-invasive bladder cancer: recommendations from the IBCG. *Nat. Rev. Urol.* **14**, 244–255 (2017).
 18. Schreiber, R. D. Cancer Immunoediting : Integrating Suppression and Promotion. **1565**, 1565–1571 (2014).
 19. Potts, K. G. *et al.* Deletion of F4L (ribonucleotide reductase) in vaccinia virus produces a selective oncolytic virus and promotes anti-tumor immunity with superior safety in bladder cancer models. *Embo Mol. Med.* **9**, 638–654 (2017).
 20. Brausi, M. *et al.* Side effects of bacillus calmette-guérin (BCG) in the treatment of intermediate- and high-risk Ta, T1 papillary carcinoma of the bladder: Results of the EORTC genito-urinary cancers group randomised phase 3 study comparing one-third dose with full dose an. *Eur. Urol.* **65**, 69–76 (2014).

21. Beatty, G. L. & Gladney, W. L. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clinical Cancer Research* **21**, 687–692 (2015).
22. Fridman, W. H. From Cancer Immune Surveillance to Cancer Immunoediting: Birth of Modern Immuno-Oncology. *J. Immunol.* **201**, 825–826 (2018).
23. Palm, N. W. & Medzhitov, R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol. Rev.* **227**, 221–233 (2009).
24. Lemay, C. G. *et al.* Harnessing oncolytic virus-mediated antitumor immunity in an infected cell vaccine. *Mol. Ther.* **20**, 1791–9 (2012).
25. Elavazhagan, S. *et al.* Granzyme B Expression Is Enhanced in Human Monocytes by TLR8 Agonists and Contributes to Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *J. Immunol.* **194**, 2786–2795 (2015).
26. Voskoboinik, I., Whisstock, J. C. & Trapani, J. A. Perforin and granzymes: Function, dysfunction and human pathology. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 388–400 (2015).
27. Li, M., Liu, X., Zhou, Y. & Su, S. B. Interferon- γ : the modulators of antiviral, antitumor, and immune responses. *J. Leukoc. Biol.* **86**, 23–32 (2009).
28. Samuel, C. E. Antiviral Actions of Interferons. **14**, 778–809 (2001).
29. Ali, H. R. *et al.* Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol* **13**, 1014–1022 (2015).
30. Blankenstein, T., Coulie, P. G., Gilboa, E. & Jaffee, E. M. The determinants of tumour immunogenicity. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 307–313 (2012).

31. Filley, A. C. & Dey, M. Immune System, Friend or Foe of Oncolytic Virotherapy? *Front. Oncol.* (2017). doi:10.3389/fonc.2017.00106
32. Yang, Y. Cancer immunotherapy: Harnessing the immune system to battle cancer. *J. Clin. Invest.* **125**, 3335–3337 (2015).
33. Oliver Fuge, Nikhil Vasdev, Paula Allchorne, J. Immunotherapy for bladder cancer REVIEW. *Dovepress open access to Sci. Med. Res. Res. Reports Urol.* 65–79 (2015). doi:10.2147/RRU.S63447
34. Pym, A. S., Brodin, P., Brosch, R., Huerre, M. & Cole, S. T. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol. Microbiol.* **46**, 709–717 (2002).
35. Hsu, T. *et al.* The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 12420–12425 (2003).
36. Hadaschik, B. A. *et al.* Oncolytic vesicular stomatitis viruses are potent agents for intravesical treatment of high-risk bladder cancer. *Cancer Res.* **68**, 4506–4510 (2008).
37. Donin, N. M. *et al.* Review Article Immunotherapy for the Treatment of Urothelial Carcinoma. *J. Urol.* **197**, 14–22 (2017).
38. Sun, E. *et al.* Recombinant h IFN- α 2b-BCG inhibits tumor growth in a mouse model of bladder cancer. 183–194 (2015). doi:10.3892/or.2015.3985
39. Fukuhara, H., Ino, Y. & Todo, T. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer

- treatment at dawn. *Cancer Sci.* **107**, 1373–1379 (2016).
40. Therapy, V., Harrington, K. J., Vile, R. G. & Pandha, H. S. Viral Therapy of Cancer Editors. *Cancer* (2008).
 41. Chiocca, E. A. Oncolytic viruses. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 938–50 (2002).
 42. Lichty, B. D., Power, A. T., Stojdl, D. F. & Bell, J. C. Vesicular stomatitis virus: Re-inventing the bullet. *Trends Mol. Med.* **10**, 210–216 (2004).
 43. Stojdl, D. F. *et al.* VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* **4**, 263–275 (2003).
 44. Roy, D. G. *et al.* Oncolytic vesicular stomatitis virus expressing interferon- γ has enhanced therapeutic activity. *Off. J. Am. Soc. Gene Cell Ther.* **3**, 16001 (2016).
 45. Prestwich, R. J. *et al.* Tumor infection by oncolytic reovirus primes adaptive antitumor immunity. *Clin. Cancer Res.* **14**, 7358–7366 (2008).
 46. Meyers, D. E., Wang, A. A., Thirukkumaran, C. M. & Morris, D. G. Current Immunotherapeutic Strategies to Enhance Oncolytic Virotherapy . *Front. Oncol.* **7**, 114 (2017).
 47. Kaufman, H. L., Kohlhapp, F. J. & Zloza, A. Oncolytic viruses: A new class of immunotherapy drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 642–662 (2015).
 48. Angarita, F. A., Acuna, S. A., Ottolino-Perry, K., Zerhouni, S. & McCart, J. A. Mounting a strategic offense: Fighting tumor vasculature with oncolytic viruses. *Trends Mol. Med.* **19**, 378–392 (2013).
 49. Kirn, D. H. & Thorne, S. H. Targeted and armed oncolytic poxviruses: A novel

- multi-mechanistic therapeutic class for cancer. *Nature Reviews Cancer* **9**, 64–71 (2009).
50. Pol, J., Kroemer, G. & Galluzzi, L. First oncolytic virus approved for melanoma immunotherapy. 8–11 (2016). doi:10.1080/2162402X.2015.1115641
 51. Wicks, I. P. & Roberts, A. W. Targeting GM-CSF in inflammatory diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* **12**, 37–48 (2016).
 52. Taguchi, S., Fukuhara, H., Homma, Y. & Todo, T. Current status of clinical trials assessing oncolytic virus therapy for urological cancers. 10–12 (2017). doi:10.1111/iju.13325
 53. Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 97–111 (2017).
 54. Sivanandam, V., Larocca, C. J., Chen, N. G., Fong, Y. & Warner, S. G. Oncolytic Viruses and Immune Checkpoint Inhibition : The Best of Both Worlds. *Mol. Ther. Oncolytics* **13**, 93–106 (2019).
 55. Bulletin, T. ENLITEN® ATP Assay System Bioluminescence Detection Kit for ATP Measurement ENLITEN® ATP Assay System Bioluminescence Detection Kit for ATP Measurement.
 56. Lines, C. Systematic Review : Characteristics and Preclinical Uses of Bladder Cancer. **4**, 169–183 (2018).
 57. Krysko, D. V, Garg, A. D., Kaczmarek, A. & Krysko, O. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 860–875 (2012).

58. Donnell, A. O. *Cancer Cell Culture Edited by.* (2014).
59. Italiani, P. & Boraschi, D. From monocytes to M1 / M2 macrophages : phenotypical vs . functional differentiation. **5**, 1–22 (2014).
60. Satish L. Deshmane, 1 Sergey Kremlev, 1 Shohreh Amini, 1, 2 and Bassel E. Sawaya1. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J. Interf. CYTOKINE Res.* **29**, (2009).
61. Liu, Y., Beyer, A. & Aebersold, R. Review On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell* **165**, 535–550 (2016).
62. Tai, L. *et al.* Phosphodiesterase-5 inhibition reduces postoperative metastatic disease by targeting surgery-induced myeloid derived suppressor cell-dependent inhibition of Natural Killer cell cytotoxicity. *Oncoimmunology* **7**, 1–12 (2018).
63. Meerloo, J. Van & Cloos, J. Chapter 20 Cell Sensitivity Assays : The MTT Assay. (2011). doi:10.1007/978-1-61779-080-5
64. Hong, I. Stimulatory versus suppressive effects of GM-CSF on tumor progression in multiple cancer types. *Exp. Mol. Med.* **48**, e242-8 (2016).
65. Magna, M. & Pisetsky, D. S. The Role of HMGB1 in the Pathogenesis of Inflammatory and INFLAMMATORY AND AUTOIMMUNE. 138–146 (2014). doi:10.2119/molmed.2013.00164
66. Fang, M. *et al.* Thermal Degradation of Small Molecules: A Global Metabolomic Investigation. *Anal. Chem* (2015). doi:10.1021/acs.analchem.5b03003
67. Allard, D., Turcotte, M. & Stagg, J. Targeting A2 adenosine receptors in cancer.

- 333–339 (2017). doi:10.1038/icb.2017.8
68. Sansom, D. M., Manzotti, C. N. & Zheng, Y. What 's the difference between CD80 and CD86 ? **24**, 313–318 (2003).
69. Møller, H. J. Soluble CD163. **5513**, (2012).
70. Krensky*, A. M. & Ahn, and Y.-T. Mechanisms of Disease: regulation of RANTES (CCL5) in renal disease. *Nat Clin Pr. Nephrol* **3**, 164–170 (2007).
71. Dufour, J. H. *et al.* IFN- γ -Inducible Protein 10 (IP-10; CXCL10)-Deficient Mice Reveal a Role for IP-10 in Effector T Cell Generation and Trafficking. **10**, (2019).
72. Chan, E., Patel, A., Heston, W. & Larchian, W. Mouse orthotopic models for bladder cancer research. *BJU Int.* **104**, 1286–1291 (2009).
73. Siolas, D. & Hannon, G. J. Patient-derived tumor xenografts: Transforming clinical samples into mouse models. *Cancer Res.* **73**, 5315–5319 (2013).
74. Njucrl, N. N.-P. I. RESEARCH MODELS NOD CRISPR Prkdc Il2r Gamma (NCG) Triple-Immunodeficient Mouse Model.
75. Lee, S. H. *et al.* Tumor Evolution and Drug Response in Patient-Derived Organoid Models of Bladder Cancer. *Cell* **173**, 515-528.e17 (2018).
76. Es, H. A., Montazeri, L., Aref, A. R., Vosough, M. & Baharvand, H. Personalized Cancer Medicine : An Organoid Approach Personalized Cancer Medicine : An Organoid Approach. *Trends Biotechnol.* (2018). doi:10.1016/j.tibtech.2017.12.005

