



**HAL**  
open science

# Développement de virus HSV-1 (virus de l'herpes simplex de type 1) oncolytiques ciblés pour traiter les carcinomes hépatocellulaires

Aldo Decio Pourchet

► **To cite this version:**

Aldo Decio Pourchet. Développement de virus HSV-1 (virus de l'herpes simplex de type 1) oncolytiques ciblés pour traiter les carcinomes hépatocellulaires. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10155 . tel-00603671

**HAL Id: tel-00603671**

**<https://theses.hal.science/tel-00603671>**

Submitted on 27 Jun 2011

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 155-2010

Année 2010

THÈSE

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole doctorale : Biologie Moléculaire Intégrative et Cognitive

DIPLOME DE DOCTORAT

(Arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 28 septembre 2010

par

Aldo POURCHET

**DÉVELOPPEMENT DE VIRUS HSV-1 ONCOLYTIQUES CIBLÉS  
POUR TRAITER LES CARCINOMES HÉPATOCELLULAIRES**

Directeur de thèse : Alberto EPSTEIN

JURY :

Monsieur Jérôme LAMARTINE (président)

Monsieur Karim BENIHOUD (rapporteur)

Monsieur Nicolas FERRY (rapporteur)

Monsieur Alberto EPSTEIN

## UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

### **Président de l'Université**

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie  
Universitaire

Secrétaire Général

**M. le Professeur L. Collet**

M. le Professeur J-F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

### **COMPOSANTES SANTE**

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation

Département de Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

### **COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE**

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et  
Sportives

Observatoire de Lyon

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut de Science Financière et d'Assurance

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. le Professeur F. Gieres

Directeur : M. le Professeur C. Gautier

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Directeur : M. N. Siauve

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Directeur : Mme S. Fleck

Directeur : M. le Professeur P. Hantzpergue

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M R. Bernard

## Remerciements

Je tiens à remercier Alberto en premier lieu pour m'avoir donné à découvrir un sujet passionnant et vaste, la virothérapie oncolytique, et pour m'avoir permis de mener un projet créatif qui entreprend de nombreux domaines scientifiques.

Je remercie Anna Greco, pour avoir été là dans des moments déterminants pour mes résultats et pour ses conseils scientifiques et pratiques (et d'informatique) qui rendent le travail plus efficace et agréable.

Je remercie tous les membres de l'équipe, passés et présents, pour l'ambiance qu'ils ont su créer, leur amitié et tout ce qui a contribué à la réussite de ma thèse. Merci à Joëlle Thomas, Aleth Callé, Karine Thoinet, Coline Biollay, Corinne Potel, Loredana Arata, Matias Melendez mon co-thésard et Pascal Trempat. J'ai une pensée particulière pour Eliza Tsitoura et Delphine Cuchet qui m'ont entouré de leurs bons conseils au début de ce travail.

Je salue Patrick Lomonte et son équipe avec qui nous avons partagé l'espace de travail. Je remercie Mirna Sabra pour nos échanges et son aide précieuse, Frédéric Catez pour ses conseils tactiques et pédagogiques.

Grâce au projet THOVLEN, j'ai pu voyager et rencontrer des personnes qui ont compté pour ma thèse. Je tiens à remercier pour leur aide essentielle : Ilaria Volpi, Peggy Marconi, Peli Foka, Penelope Mavromara, Ruben Hernandez-Alcoceba et Roberto Manservigi

Enfin, je remercie ma famille et mes amis, tous les gens qui m'ont accompagné de leur présence et de leurs conseils : Claire et Olivier, Annie et Julien, Myriam, Camille (from the Balloon), Arnault, Patricia Odet et tous les autres.

Le CGMC dans son ensemble fut un véritable lieu de vie qui contribua à la réussite de mon travail.

## Résumé

Mon projet est de développer des virus HSV-1 oncolytiques ciblés au niveau de la transcription afin qu'ils se multiplient dans les cellules de carcinome hépatocellulaire (HCC) et les détruisent.

Le premier objectif a été de sélectionner des promoteurs de gènes cellulaires actifs spécifiquement dans les HCC. Les promoteurs ont été pré-sélectionnés par une recherche bibliographique et en utilisant la base de donnée UniGene puis leur activité a été vérifiée par RT-qPCR et CHIP dans nos lignées modèles HCC et dans des hépatocytes. J'ai cloné ces promoteurs dans des plasmides exprimant la luciférase puis j'ai inséré ces cassettes d'expression dans la région intergénique 20 du génome HSV-1 afin d'étudier l'activité des promoteurs dans le contexte d'une infection virale. Ces promoteurs ont été caractérisés selon leur force d'activité, deux cinétiques d'activité et leur activité différentielle en fonction du type cellulaire. De ces expériences, j'ai sélectionné le promoteur de l'angiopoïétine-like 3 (ANGPTL3) et de l'alpha foetoprotéine comme étant les plus efficaces pour cibler les HCC. J'ai également démontré le caractère inductible d'un promoteur contenant des éléments de réponse à l'hypoxie (HRE), une situation présente au centre des tumeurs solides à cause d'un manque de vascularisation.

Le deuxième objectif a été de construire les virus oncolytiques ciblés proprement dits. Nous avons décidé de cibler l'expression de la protéine Us3, une protéine virale impliquée dans le contrôle de la réponse apoptotique induite par HSV-1. L'expression de la protéine Us3 est placée sous contrôle d'un promoteur cellulaire spécifique d'HCC. L'hypothèse est qu'en l'absence d'activité du promoteur cellulaire dans les cellules non HCC, la protéine Us3 ne sera pas synthétisée et, par conséquent, l'apoptose qui ne sera pas réprimée, inhibera le cycle de réplication et par conséquent, la production virale dans les cellules saines. Dans les cellules HCC, où le promoteur cellulaire contrôlant Us3 sera actif, le cycle de réplication virale pourra aboutir à la destruction de la cellule infectée et à la production de virus qui s'amplifieront dans la masse tumorale et la détruiront. Dans un premier temps, en utilisant la technique de recombinaison en plasmide BAC (Bacterial artificial chromosome), j'ai construit un virus HSV-1 privé du gène codant la protéine Us3. Ensuite, j'ai réintroduit le gène Us3 sous contrôle du promoteur ANGPTL3 dans la région intergénique 20. J'ai, en parallèle, construit un virus semblable où l'expression d'Us3 est sous le contrôle du promoteur HRE (hypoxia responsive element) en condition d'hypoxie. Le comportement oncolytique de ces virus a été étudié en réalisant des courbes de croissance sur lignées cellulaires d'HCC et cellules hepatocyte-like. Je suis en train d'étudier la régulation de l'apoptose par ces virus au moyen de tests de cytotoxicité et de mesure de l'activité caspase.

## Summary

Our long-term purpose is to develop transcriptionally targeted oncolytic vectors, derived from herpes simplex virus type 1 (HSV-1), designed to eradicate hepatocellular carcinomas (HCC). We have identified several HCC-specific promoters, as well as other cancer-specific promoters, that maintain their specificity when expressed from the virus genome. More precisely, we have demonstrated that these promoters are able to drive reporter gene (luciferase) expression from the virus genome in HCC-derived cells, both in cultured cells and in nude mice, but not in fresh human hepatocytes or in the WRL38 hepatocyte-like cells. HSV-1 infection induces, but then inhibits, a cellular antiviral apoptotic response, and the early virus protein US3 is a key actor in inhibiting apoptosis. We have hypothesized that inhibition of US3 expression in hepatocytes should lead to early apoptotic death of these cells, therefore precluding virus multiplication and spread. In contrast, expression of US3 in cancer cells is expected to block apoptosis, leading to the achievement of the virus life cycle, cell lysis, and virus spread within the tumours. We report in this communication the construction and properties of two different potentially oncolytic HSV-1 vectors. One of them expresses US3 protein under the control of the HCC-specific promoter ANGPTL3, while the second promoter contains 9 repeats of the hypoxia responsive elements of vascular-endothelial growth factor (VEGF) (9xHRE promoter). Growth curves of these viruses were performed on different HCC cell lines to show their oncolytic properties.

## Abréviations

Aa : acide aminé  
ANGPTL3 : Angiopoïétine-like 3  
APC : antigen presenting cell  
BAC : Bacterial artificial chromosome  
ChIP : Chromatine Immuno Precipitation  
CHX : cycloheximide  
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité  
CNS : système nerveux central  
CSC : cancer stem cell  
DAS : Downstream Activated Sequence  
DC : Dendritic Cell  
DFO : déféroxamine  
DRG : ganglion nerveux de la chaîne dorsale  
ECP : effet cytopathogène  
GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor  
HCC : hepatocellular carcinoma  
hpi : heures post infection  
HRE : Hypoxia Responsive Element  
HSV-1 : Herpes Simplex Virus type I  
HVEM : herpesvirus entry mediator  
ICP : Infected Cell Polypeptide  
IL : interleukine  
m.o.i. : multiplicity of infection  
miRNA : micro RNA  
NK : natural killer cell  
OIS : oncogene induced senescence  
PAA : acide phosphonoacétique  
Pb : paire de base  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
Pfu : plaque forming unit  
PNS : système nerveux périphérique  
RFA : ablation par radiofréquence  
RIS : ROS induced senescence  
RT-qPCR : PCR quantitative sur échantillon traité avec la reverse transcriptase (RT)  
T CD4+ : lymphocyte T cluster de différenciation 4  
Th : lymphocyte T helper  
TK : thymidine kinase  
TLR : toll-like receptor

## **INTRODUCTION**

<b>1. LE VIRUS DE L'HERPES SIMPLEX DE TYPE I.....</b>	<b>9</b>
<b>A. Le cycle lytique.....</b>	<b>9</b>
Le tropisme viral	
L'effet cytopathogène	
L'expression génique	
La structure des promoteurs HSV-1	
<b>B. Fonctions cellulaires modulées par l'infection HSV-1.....</b>	<b>14</b>
La voie de signalisation NF-κB	
L'apoptose	
<b>C. L'infection par HSV-1a des effets pro et antiapoptotiques.....</b>	<b>19</b>
L'apoptose est inhibée par le virus	
Fonctions virales impliquées dans le contrôle de l'apoptose	
<b>D. Les différents rôles de la protéine virale Us3.....</b>	<b>23</b>
<b>2. LES HEPATOCARCINOMES.....</b>	<b>27</b>
<b>A. Epidémiologie.....</b>	<b>27</b>
<b>B. Diagnostique et traitement.....</b>	<b>27</b>
<b>C. Biologie générale des HCC.....</b>	<b>28</b>
<b>D. Caractérisation moléculaire des HCC.....</b>	<b>29</b>
<b>E. L'environnement tumoral et le système immunitaire.....</b>	<b>34</b>
<b>3. LA VIROTHERAPIE ONCOLYTIQUE.....</b>	<b>38</b>
<b>A. Historique.....</b>	<b>38</b>
<b>B. Virus HSV-1 oncolytiques atténués.....</b>	<b>39</b>
<b>C. Virus HSV-1 oncolytiques ciblés.....</b>	<b>44</b>
<b>OBJECTIFS de mon travail de thèse. Le projet THOVLEN.....</b>	<b>50</b>

<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>52</b>
1. Cellules	
2. Virus	
3. Infection avec les virus HSV-1	
4. Promoteurs et plasmides	
5. Extraction d'AND viral	
6. Construction des virus recombinants Cgal+ IGR20 prom Luc, D30EBA IGR20 prom Luc, 17+ ANGPTL3 Us3 et 17+ 9xHRE Us3	
7. Construction du virus recombinant 17+ Us3-galK+ par la technique BAC	
8. Tests $\beta$ -galactosidase/Luciférase	
9. Détermination de la cinétique d'activation des promoteurs à l'aide de l'acide phosphonoacétique (PAA)	
10. Analyse des proteines par Western Blot	
11. Infection en condition d'hypoxie	
12. Protocole experimental in vivo	
13. Analyses statistiques	
<b>RESULTATS.....</b>	<b>58</b>
<b>I. Identification de promoteurs à activité spécifique des HCC.....</b>	<b>58</b>
1. Approche bioinformatique.....	58
2. Analyse de la transcription par RT-PCR.....	63
<b>II. Méthodologie pour l'étude des promoteurs de ciblage.....</b>	<b>66</b>
1. Analyse des promoteurs par l'activité luciférase dans les plasmides pGl3 et pIGR20.....	66
2. Construction des virus recombinants Cgal+ IGR20 promoteur Luc.....	69
3. Structures des génomes recombinants.....	71
4. Tests luciférase et $\beta$ -galactosidase. Normalisation.....	72
5. Utilisation de la déféroxamine (DFO) pour mimer les conditions d'hypoxie.....	77
6. Vérification des capacités de replication des virus recombinants.....	79
<b>III. Etude des promoteurs de ciblage.....</b>	<b>81</b>

<b>1. Comportement d'un virus recombinant sur différentes lignées cellulaires et étude de son promoteur. Cas des virus ANGPTL3 et hCMV.....</b>	<b>81</b>
<b>2. Etude de l'activité des promoteurs d'intérêt au cours d'un seul cycle de replication.....</b>	<b>87</b>
a. Etudes de cinétique des différents promoteurs d'intérêt.....	87
b. Dépendance des promoteurs cellulaires vis à vis des fonctions d'HSV-1.....	90
c. Comparaison de l'activité des promoteurs dans les cellules Huh7 et dans les hépatocytes primaires humains.....	95
<b>3. Etude in vivo des promoteurs de ciblage.....</b>	<b>99</b>
<b>4. Conclusions de l'étude des promoteurs de ciblage.....</b>	<b>102</b>
<b>IV. Virus oncolytiques ciblant l'expression de la protéine virale Us3.</b>	
<b>1. Construction des virus oncolytiques.....</b>	<b>103</b>
<b>2. Caractérisation génétique des virus Us3 recombinants.....</b>	<b>105</b>
<b>3. Analyse de l'expression d'Us3 sous contrôle des promoteurs ANGPTL3 et 9xHRE.....</b>	<b>106</b>
<b>4. Croissance des virus oncolytiques.....</b>	<b>107</b>
<b>DISCUSSION, CONCLUSIONS.....</b>	<b>112</b>
<b>PERSPECTIVES.....</b>	<b>118</b>
<b>ANNEXE - ARTICLE.....</b>	<b>120</b>

# Introduction

La virothérapie oncolytique des carcinomes hépatocellulaire (HCC) est un sujet qui emprunte les principes de son fonctionnement à la fois à la virologie et à la cancérologie. Dans la première partie de ce rapport, j'expliquerai le cycle lytique du virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) en insistant sur l'activité des promoteurs viraux. Je décrirai plusieurs fonctions virales pertinentes à ce sujet et leurs interactions avec certains processus cellulaires, tout particulièrement celles qui sont en relation avec l'induction et la répression de l'apoptose cellulaire. L'aspect cancérologie sera principalement abordé à travers la problématique des marqueurs tumoraux qui se révèlent être parfois des cibles thérapeutiques ou des outils pour le ciblage de l'expression génique dans les cellules tumorales. Je présenterai également des éléments d'anatomo-histologie et d'immunologie se rapportant au foie et aux HCC. Enfin la troisième et dernière partie de cette introduction regroupera des particularités propres à l'infection oncolytique et présentera les différents virus HSV-1 oncolytiques actuellement utilisés dans des études cliniques et précliniques.

## 1. LE VIRUS DE L'HERPES SIMPLEX DE TYPE I

### A. Le cycle lytique

La survie des virus en tant que parasites obligés des cellules vivantes, résulte d'une interaction durable avec l'organisme hôte. La forme de cette dépendance s'est adaptée au cours du temps à la nature plus ou moins complexe de l'hôte. Dans le cas d'HSV-1, la stratégie de survie comprend deux étapes qui alternent dans le temps : une étape cytolytique et une étape cytotatique. L'étape cytolytique a lieu dans les cellules épithéliales et généralement n'affecte pas la survie de l'hôte. C'est une étape de production de virions qui va permettre aux virus de se multiplier, de pénétrer dans le système nerveux périphérique (PNS), et de se disséminer à d'autres individus. L'étape cytotatique a lieu dans les neurones sensitifs rejoignant les ganglions trijumeaux ou des ganglions de la chaîne dorsale (DRG). Dans ces cellules, le virus s'établit à l'état latent, son génome prenant alors la forme d'un épisome dans le noyau du neurone. Le génome viral peut alors rester en latence pendant de longues périodes. Plusieurs stimuli peuvent provoquer la réactivation de ce génome et la production de particules infectieuses. Le cycle viral entre alors dans une nouvelle phase cytolytique à laquelle succédera une nouvelle phase cytotatique. Dans de rares cas, (1/500 000) l'infection HSV-1 peut se propager dans le système nerveux central (CNS) et provoquer la mort de l'hôte par encéphalite. Un individu infecté par HSV-1 devient un porteur permanent du virus.

La succession de ces deux phases d'infection rend compte d'un équilibre complexe qui évite la mort du porteur de l'infection et permet la survie du virus. La théorie de l'évolution explique cette stratégie par la sélection de gènes chez l'hôte et chez le virus, conduisant à une adaptation réciproque. D'un point de vue moléculaire, chaque étape du cycle viral est perçue comme le résultat d'un ensemble d'actions et de réactions initiées par le virus et par l'hôte. Le consensus actuel est que le virus prend le contrôle de la cellule infectée. Il lutte contre les mécanismes de défense cellulaire et détruit la cellule lors de sa multiplication. Il possède à la fois des gènes exprimant des fonctions

directement cytolitiques (ou toxiques), des gènes exprimant des protéines capables de contrôler les différentes réponses cellulaires antivirales et l'action antivirale du système immunitaire, ainsi que des gènes lui permettant un contrôle de la machinerie de réplication cellulaire. L'expression de ces fonctions lui permet d'assurer son cycle de multiplication. Cependant, l'infection est limitée par l'action du système immunitaire adaptatif. Dans les neurones, l'environnement cellulaire favorise la répression de l'expression du génome viral et l'échappement à la réponse immune. Même si, au niveau cellulaire, le virus arrive à prendre le contrôle des fonctions cellulaires, à l'échelle de l'organisme, c'est le système immunitaire adaptatif qui l'emporte. Dans le cas d'HSV-1, l'établissement de la latence fait penser à une forme de cohabitation, ou de persistance de l'infection. Dans le reste de ce rapport bibliographique, je me focaliserai presque exclusivement sur différents aspects du cycle viral lytique, car les virus oncolytiques tirent leurs avantages thérapeutiques de leur capacité à lyser les cellules infectées et à se propager aux cellules voisines.

**Le tropisme viral.** Le virus HSV-1 réalise son cycle de multiplication lytique dans les kératinocytes péribuccaux et les cellules de la muqueuse buccale. La propagation des virions permet d'infecter les terminaisons de neurones sensitifs et d'y installer de nouvelles copies du génome HSV-1 sous la forme d'un épisome chromatinisé situé dans le noyau. Le tropisme du virus HSV-1 est qualifié d'épithélial et de neuronal, dans la mesure où HSV-1 doit s'installer dans les cellules nerveuses des ganglions trijumeaux pour maintenir son génome en latence au cours du temps. Du point de vue épidémiologique, 90% des adultes sont porteurs du virus HSV-1 (43).

En culture de cellules, le tropisme d'HSV-1 est beaucoup plus large. HSV-1 peut infecter de nombreux types cellulaires, principalement grâce à la présence des récepteurs ubiquistes, appelés Hve (Herpesvirus entry receptors), tels que HVEM, Nectin-1, Nectin-2, et les molécules d'héparan sulfate (30, 147). En outre, toutes les étapes du cycle viral sont soumises à l'action de facteurs intracellulaires qui affectent aussi le tropisme viral. Ainsi, par exemple, dans le cas de la transcription et de la réplication d'HSV-1, la présence du facteur de transcription Oct-2 ou des kinases cycline-dépendantes, est un élément déterminant de la capacité du virus HSV-1 à réaliser son cycle de vie, particulièrement dans les neurones (50, 188, 207). La présence de ces protéines intracellulaires est donc un élément à prendre en compte dans la définition du tropisme. Nous verrons plus loin, que ces considérations sur le tropisme d'HSV-1 vont concerner également son ciblage thérapeutique.

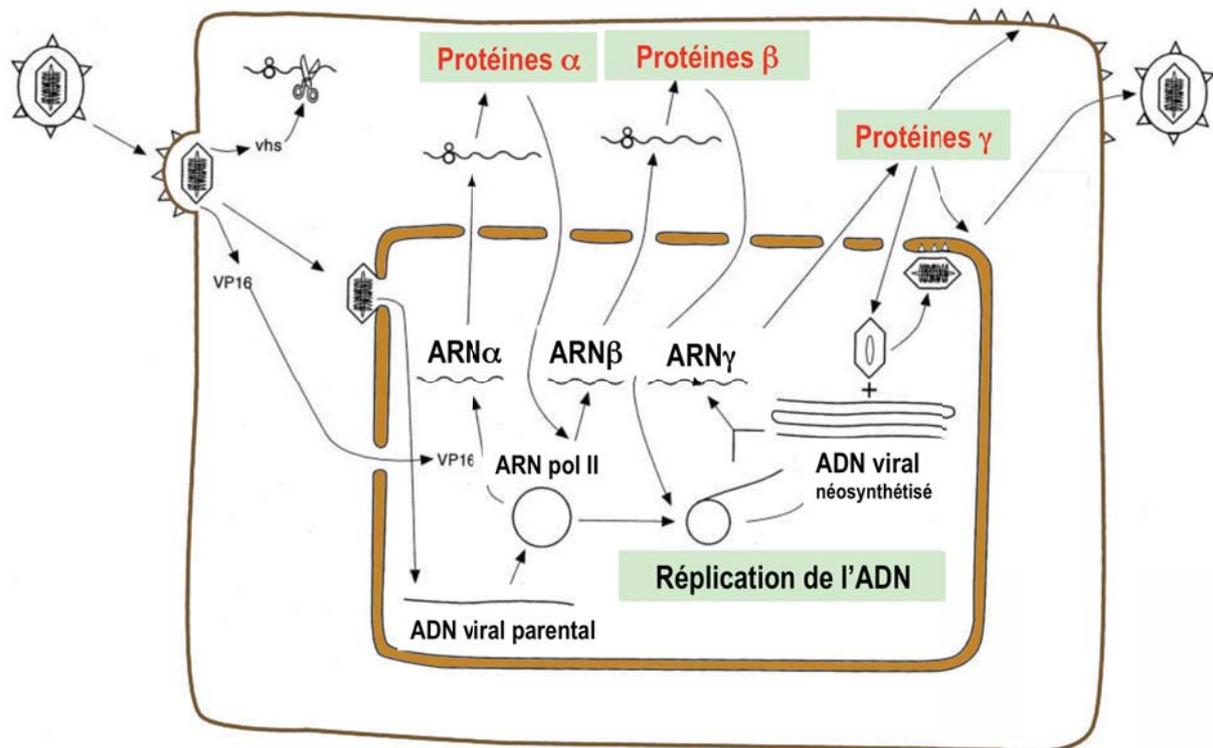
**L'effet cytopathogène (ECP)** peut être défini comme l'ensemble des manifestations cellulaires résultantes d'une infection virale productive. Dans le cas de l'infection par HSV-1, l'ECP s'achève par la mort cellulaire comme conséquence des modifications provoquées par le virus et par la réponse cellulaire à l'infection. En l'absence de marqueurs de mort apoptotique, cette mort est communément considérée comme de type nécrotique, bien qu'elle ne soit pas encore complètement caractérisée. L'ECP est décrit essentiellement d'un point de vue morphologique. Une des plus précoces manifestations de l'infection est l'élargissement du nucléole et son déplacement vers la membrane nucléaire; il sera plus tard fragmenté. Dans le même temps, les chromosomes se marginalisent près de la membrane nucléaire et un réarrangement du réseau de microtubules est observé. Un changement dans l'apparence des membranes cellulaires est également caractéristique de l'infection en phase tardive. Ainsi, on observe une perte de protéines membranaires, qui se traduit par l'arrondissement de la

cellule, une augmentation du volume du noyau et un éclatement de l'appareil de Golgi en petites vésicules. Les modifications biochimiques accompagnant cet état sont encore méconnues. On observe essentiellement une diminution de la synthèse de macromolécules cellulaires. Les protéines cellulaires sont sélectivement dégradées, stabilisées, ou subissent des modifications et certaines sont redirigées pour réaliser de nouvelles tâches, en même temps que les protéines virales s'accumulent. Le métabolisme de la cellule infectée par HSV-1 est aussi fortement modifié (49).

**L'expression génique.** L'ADN viral est transcrit au cours du cycle lytique par la RNA polymérase II avec la participation de facteurs viraux et cellulaires. La synthèse des produits de gènes viraux est précisément coordonnée. Le génome contient environ 85 gènes qui s'expriment en cascade et de manière successive, donnant lieu à la synthèse de 3 classes de protéines : les protéines très précoces, précoces et tardives (ou  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$ , respectivement). La réplication de l'ADN commence après la synthèse des protéines  $\beta$ . Les gènes  $\gamma$ , qui expriment les protéines du virion, se subdivisent en  $\gamma_1$  et  $\gamma_2$  selon leur degré de dépendance à la synthèse de l'ADN viral (180). Les gènes  $\alpha$  ont besoin de l'activité activatrice de la protéine virale VP16, apportée par le virus entrant, pour être exprimés. Cette expression, qui démarre dès l'arrivée du génome viral dans le noyau cellulaire, est maximum entre 2 et 4 heures post infection (hpi), en fonction de la multiplicité d'infection (m.o.i.) et du type cellulaire. Les gènes  $\alpha$  sont au nombre de 6 et leurs protéines sont appelées ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, Us1.5 et ICP47 (ICP : Infected Cell Polypeptide). Ces protéines participent de manière légèrement différente, en fonction du type cellulaire, à l'activation des gènes  $\beta$  et  $\gamma$ . Seules les protéines ICP4 et ICP27 sont essentielles dans ce rôle. ICP4 est un activateur de la transcription qui se lie à l'ADN et interagit avec les facteurs de transcription généraux de la cellule. ICP27 est un activateur qui agit au niveau post-transcriptionnel. En se liant aux transcrits viraux et cellulaires, ICP27 inhibe l'épissage des ARN cellulaires et permet la translocation des ARN viraux non épissés vers le cytoplasme (180). Comme nous le verrons plus loin, ICP27 joue aussi un rôle anti-apoptotique très important. La protéine ICP0 est un activateur de la transcription qui ne se lie pas à l'ADN. Elle joue un rôle important dans l'inhibition de la réponse cellulaire innée, grâce à son activité ubiquitine E3-ligase, qui lui permet d'envoyer vers la dégradation protéolytique plusieurs protéines cellulaires participant à l'extinction de l'expression des gènes viraux (180). La synthèse des protéines  $\beta$  est dépendante de l'expression de la protéine ICP4 et atteint un taux maximum entre 4 et 8 hpi. Les protéines  $\beta$  sont impliquées dans la réplication de l'ADN viral, le métabolisme des nucléotides et l'activation des gènes  $\gamma_1$ . Les protéines  $\beta$  sont divisées en deux groupes. Les protéines  $\beta_1$  sont synthétisées très rapidement, voir de manière concomitante aux protéines  $\alpha$ . Les protéines  $\beta_2$  apparaissent après la fin de la synthèse des protéines  $\alpha$ . Ce délai pourrait s'expliquer par une activation de la transcription nécessitant préférentiellement la protéine ICP27. Les gènes  $\gamma$  sont exprimés après le début de la synthèse d'ADN viral et leur expression est amplifiée par la réplication des génomes viraux. Elles codent pour les protéines de la capsid, du téguement et de l'enveloppe viraux. La figure I schématise le cycle de réplication du virus HSV-1.

L'expression des gènes HSV-1 est essentiellement contrôlée par des protéines viraux impliquées dans la transcription ou dans l'environnement transcriptionnel. Des facteurs cellulaires sont recrutés par HSV-1 pour participer à la transcription. De plus, l'infection par HSV-1 impose un arrêt en phase G1/S aux cellules asynchrones en

croissance et empêche l'entrée en phase G1 des cellules quiescentes (55). La réplication du virus HSV-1 se produit ainsi à un moment précis du cycle cellulaire. L'expression des gènes HSV-1 codant pour les protéines ICP4, ICP0, ICP27, gB et gD est réduite en présence d'un inhibiteur de la protéine cdk9. D'autres expériences montrent plus précisément que la kinase cdk9 optimise l'expression des gènes viraux dépendant de la protéine ICP22 probablement en rapprochant cette protéine de la RNA polII dans le complexe de transcription (54). L'expression de nombreux gènes HSV-1 est donc considérée comme dépendante du cycle cellulaire.



**Figure I: Cycle de réplication lytique d'HSV-1.** HSV-1 est un virus humain à ADN double brin de 150 kpb qui code pour environ 80 gènes. Le virion s'attache à la membrane plasmique de la cellule et les enveloppes du virion et de la cellule fusionnent, relâchant la capsid et le tégment dans le cytoplasme. La protéine virale vhs induit la dégradation des ARNm cellulaires. La capsid est transportée vers les pores nucléaires où l'ADN viral est relargué dans le noyau. L'ADN viral se circularise puis est transcrit par l'ARN polymérase II pour donner les premiers ARNm très précoces (ou ARNm  $\alpha$ .) La transcription des gènes  $\alpha$  est stimulée par la protéine tégmentaire VP16. 5 des 6 protéines  $\alpha$  régulent l'expression des gènes viraux dans le noyau. Ces protéines  $\alpha$  transactivent la transcription des gènes précoces, ou  $\beta$ . Les protéines  $\beta$  sont impliquées dans la réplication de l'ADN viral. L'expression des gènes tardifs, ou  $\gamma$ , est initiée après la réplication virale. Les protéines  $\gamma$  sont des protéines de structure impliquées entre autres dans l'assemblage de la capsid dans le noyau et dans la modification des membranes pour la formation du virion. Après encapsidation de l'ADN, la capsid mature acquiert son enveloppe au niveau de la membrane nucléaire. Adapté de « Fields Virology » vol. 2, 4<sup>ème</sup> édition.

La définition actuelle des classes cinétiques ( $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ ) s'applique, en premier lieu, aux protéines virales. Elles sont évaluées en fonction du moment où apparaissent les protéines virales (hpi), mais aussi en fonction des conditions de synthèse (dépendance vis à vis des protéines  $\alpha$  ou de la synthèse d'ADN). Ensuite, la même catégorie est attribuée au gène correspondant et à son promoteur. Néanmoins, au niveau transcriptionnel, Wagner et ses collaborateurs ont montré que l'expression des ARN messagers (ARNm) peut commencer simultanément pour des gènes appartenant à des classes cinétiques (protéiques) différentes, dû à des contrôles post-transcriptionnels. Bien que l'expression virale d'HSV-1 soit encore considérée dans son ensemble comme ne subissant que peu de modifications post-transcriptionnelles structurales (pas d'épissage des transcrits primaires, par exemple), la synthèse des protéines est à concevoir comme un processus dynamique subissant des influences positives et négatives en fonction de l'environnement cellulaire. Ainsi, bien que similaire, le protéome d'HSV-1 peut varier en fonction du type cellulaire infecté, ce qui veut dire que, dans les mêmes conditions d'infection, le temps d'apparition d'une protéine donnée n'est pas exactement le même d'un type cellulaire à l'autre. Dans l'état actuel de nos connaissances, la définition des classes cinétiques est donc plus un outil pédagogique pour rendre compte de la complexité du cycle viral, qu'une réalité scientifiquement exploitable, ce qui est particulièrement important lorsqu'on travaille sur d'autres types cellulaires que les cellules VERO, utilisées généralement pour produire et titrer le virus.

Dans le cadre de mon travail de thèse, il m'est apparu intéressant de penser le cycle infectieux en terme d'interactome protéique agissant plutôt que comme le résultat de l'expression des gènes viraux. C'est pourquoi, dans cette étude, nous avons certes, choisi de qualifier la cinétique de nos promoteurs en fonction de certaines conditions biochimiques, mais leur réelle efficacité, en terme de ciblage oncolytique, a été évaluée par l'activité de la protéine virale ciblée. Par interactome protéique, j'entends ici l'ensemble des interactions protéines-protéines intervenant au cours du cycle de réplication du virus HSV-1 et de sa propagation virale. Enfin, pour clore le paragraphe concernant l'expression génique d'HSV-1, il convient de noter que plusieurs microRNA (miRNA) sont synthétisés au cours de l'infection productive et latente. Six miRNA ont été confirmés et, au total, les études du transcriptome des cellules infectées prédisent 14 miRNA codés par le génome HSV-1 (213). Les seules fonctions connues de ces miRNA concernent l'établissement de la latence, dans la mesure où elles répriment l'expression des gènes très précoces d'HSV-1, particulièrement ICP0 et ICP4. Dans le cycle lytique, les fonctions virales connues sont exercées seulement par des protéines.

**La structure des promoteurs HSV-1.** La structure des promoteurs viraux explique en grande partie les particularismes de l'expression génique HSV-1, notamment en ce qui concerne la définition des classes cinétiques des gènes viraux. Les promoteurs  $\alpha$  ont la séquence la plus longue. Leur prototype est le promoteur du gène codant la protéine ICP4. Ce promoteur contient plusieurs séquences de liaison à la protéine structurale VP16 (séquences consensus TAATGARAT, où R est une purine), suivies en aval par des sites de liaison des facteurs de transcription de PolII tel que Sp1, CAAT ou HCF-1 (227). La TATA box canonique se situe environ 30 paires de base (pb) en amont du codon d'initiation de la transcription. Le retro contrôle négatif de la protéine ICP4 sur sa propre transcription s'effectue grâce à un site de liaison à ICP4 situé juste après ce codon d'initiation. Le promoteur du gène de la thymidine kinase (TK) est le modèle des promoteurs des gènes  $\beta$ . Il est formé d'une TATA box avec, quelques dizaines de bases

en amont, quelques motifs permettant la liaison des facteurs de transcription généraux. La taille de ces promoteurs est d'environ 100 pb. L'absence de site de liaison aux facteurs de transcription en aval de la TATA box semble jouer un rôle déterminant dans l'arrêt de la transcription des promoteurs  $\beta$  suite à la réplication de l'ADN viral. Les promoteurs  $\beta$  sont très proches dans leur structure des promoteurs cellulaires contenant une TATA box. Les promoteurs contrôlant les gènes d'expression plus tardifs possèdent une structure similaire à celle des promoteurs  $\beta$  à laquelle sont ajoutés des éléments de stabilisation en aval de la TATA box. Ces éléments sont semblables à des structures du génome cellulaire, comme les éléments Inr et DAS (downstream activating sequence). Les promoteurs des gènes  $\gamma_1$ , codant par exemple les protéines VP5 et VP16, possèdent une séquence Inr située à proximité du site d'initiation de la transcription. Les promoteurs  $\gamma_2$ , comme celui du gène UL38, ne contiennent plus de séquences de liaison en amont de la TATA box mais possèdent en revanche un élément DAS situé environ 20 pb en aval du site d'initiation.

Une étude présentée par Yamamoto (231), utilise le gène rapporteur luciférase pour visualiser l'activité du promoteur du gène  $\alpha$  IE4/5 et du promoteur du gène  $\gamma_2$  de la glycoprotéine C. In vivo, en infectant un modèle de xénogreffe de cellules de gliome sur souris athymique, les auteurs mettent en évidence l'augmentation d'expression de la luciférase pour les deux virus sur une période de 3 jours. In vivo et in vitro, l'activité luciférase est visible dès 4 hpi avec le promoteur  $\alpha$  et continue d'augmenter jusqu'à 96 hpi. Il faut attendre 20 hpi pour détecter un début d'activité avec le promoteur  $\gamma_2$ . Après 96hpi, l'activité luciférase dépendant du promoteur  $\gamma_2$  atteint un niveau semblable à celle dépendant du promoteur  $\alpha$ . Les auteurs montrent que l'expression de luciférase conduite par les promoteurs  $\alpha$  et  $\gamma_2$  est un témoin quantifiable, respectivement, de l'infection virale et de la réplication.

## **B. Fonctions cellulaires modulées par l'infection HSV-1**

L'effet cytopathogène peut être modélisé de la manière suivante. Le virus exprime un ensemble de fonctions portées par plusieurs protéines et selon une cinétique capable d'être modifiée en fonction de l'environnement. En parallèle, les réponses cellulaires à l'infection par HSV-1 sont multiples et se développent à différents moments du cycle viral. La redondance des fonctions protéiques est un phénomène présent aussi bien chez la cellule que chez le virus et qui confère à l'interactome de l'infection HSV-1 une plasticité, ou adaptabilité, déterminée par les différences d'expression des gènes viraux en fonction du type cellulaire infecté et de la m.o.i.. En d'autre terme, l'ensemble des interactions protéine-protéine (virales et cellulaires) qui forment l'interactome de l'infection HSV-1 varie (en nombre et qualité) en fonction des conditions environnementales. Cette variation grâce à la répétition des fonctions virales et cellulaires permet la réplication virale dans des conditions qui s'éloignent de conditions optimales. La structure de ce chapitre, qui oppose les fonctions virales et cellulaires, doit permettre au lecteur de se faire une idée quant à la nature du dialogue virus-cellule pour aborder dans la suite du manuscrit les fondements de la théorie du ciblage. Dans ce chapitre, je présenterai deux types de réponses cellulaires à l'infection HSV-1 qui de par leur dynamique, illustrent la complexité des interactions entre la cellule hôte et HSV-1. Il s'agit tout d'abord d'une réponse cellulaire transcriptionnelle essentiellement provirale, c'est à dire, facilitant le développement de l'infection et impliquant le facteur de

transcription NF- $\kappa$ B et, ensuite, de la réponse cellulaire antivirale pro-apoptotique. Les fonctions virales sont portées par plusieurs protéines. Je détaillerai les différentes protéines impliquées dans la réponse virale anti-apoptotique et m'attarderai plus particulièrement sur les différents rôles de la protéine virale Us3, une sérine thréonine kinase multifonctionnelle.

**La voie de signalisation cellulaire NF $\kappa$ B.** Bien que le virus HSV-1 interagisse avec de nombreuses voies de signalisation cellulaire, je n'aborderai dans ce chapitre que la voie de signalisation qui passe par NF- $\kappa$ B, de loin la plus étudiée (figure II). D'autres voies de signalisation en rapport avec l'infection HSV1 seront traitées à d'autres endroits de ce manuscrit, particulièrement en réponse à des questions impliquant des avancées de la virothérapie oncolytique.

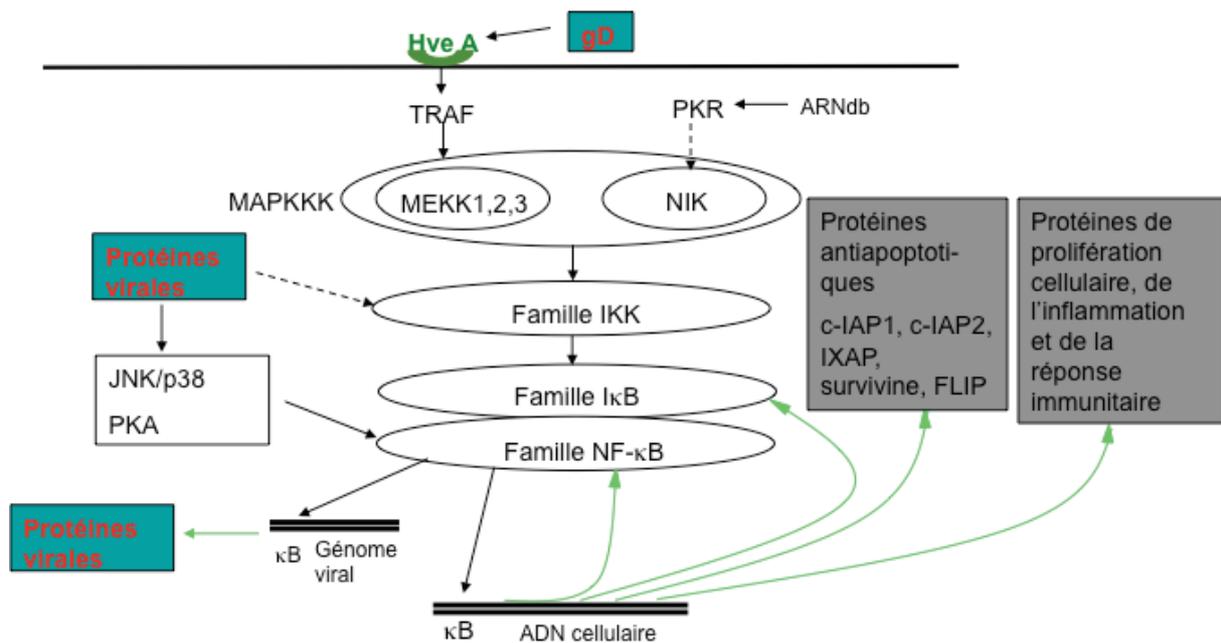
HSV-1 peut activer NF- $\kappa$ B à deux moments du cycle de réplication. La première phase d'activation est transitoire. Elle est présente dès le début de l'infection dans les cellules exprimant à leur surface la molécule HveA, (Herpesvirus entry mediator A, ou HVEM) un récepteur cellulaire capable d'interagir avec la glycoprotéine virale D (gD) (140). Cette première phase d'activation est absente lors de l'infection de cellules possédant les récepteurs HveB ou HveC. HveA est un membre de la superfamille des récepteurs TNF (TNFR) qui active NF- $\kappa$ B à travers une voie de signalisation incluant des membres de la famille TRAF (TNF receptor associated factor). Après 30 minutes d'incubation avec un virus HSV-1 inactivé par un traitement UV, ou avec la gD purifiée, l'activation de NF- $\kappa$ B induit une régulation positive de cIAP2, de FLIP (FLICE-like inhibitory protein) et de survivine dans des cellules monocytaires U937, ainsi qu'une inhibition de la caspase 8. Cette activation transitoire de NF- $\kappa$ B protège aussi la cellule de l'apoptose induite par le ligand Fas. Dans la mesure où NF- $\kappa$ B est un cofacteur de transcription indispensable à la synthèse d'interféron et à la réponse inflammatoire, ces observations suggèrent que lors de la première activation, NF- $\kappa$ B pourrait avoir un effet tant positif (anti-apoptotique) que négatif (état antiviral et réaction pro-inflammatoire) pour le déroulement de l'infection virale.

La deuxième phase d'activation de NF- $\kappa$ B est indépendante du type cellulaire (6) mais dépendante de la synthèse de protéines virales (69, 170). L'infection par HSV-1 induit une localisation nucléaire de NF- $\kappa$ B à partir de 3 hpi, qui persiste au-delà de 18 hpi (6, 170). La période correspondant à la translocation la plus intense de NF- $\kappa$ B (3 à 6 hpi), est également la période pendant laquelle sont synthétisées les protéines virales anti-apoptotiques. Il n'existe cependant aucune preuve de l'implication directe de protéines virales dans l'activation ou le transport vers le noyau de NF- $\kappa$ B (24). Certains auteurs postulent une induction de NF- $\kappa$ B par la PKR, via la phosphorylation de NIK et IKK (201). En effet, la PKR est activée par la présence d'ARN double-brin (ARNdb) viraux qui s'accumulent à partir de 3 hpi. Néanmoins, ces résultats sont contestés (70). La seule certitude est l'intégrité de l'axe IKK/I $\kappa$ B/p65 qui est toujours activé, suite à l'infection par HSV-1, dans tous les types cellulaires testés (6, 69, 70).

L'activation exogène de NF- $\kappa$ B par des esters de phorbol (PMA), lors d'une infection par une souche HSV-1- $\Delta$ ICP27 (délétée du gène ICP27), est corrélée avec une diminution de certains marqueurs de l'apoptose comme le clivage de PARP et de la procaspase 3 et favorise l'expression des protéines virales. Au contraire, l'inhibition de la dégradation d'I $\kappa$ B par la pyrrolidine dérivé de dithiocarbamate (PDTC), se traduit par le clivage de PARP et de la procaspase 3 pendant l'infection par un virus sauvage (69) et ces marqueurs augmentent proportionnellement à la quantité de I $\kappa$ B exprimée à partir

d'un vecteur adénoviral (69, 70). Ces expériences montrent l'effet dose dépendant de l'activité anti-apoptotique de NF- $\kappa$ B.

Plusieurs expériences révèlent l'effet positif général de NF- $\kappa$ B sur la réplication virale (70). Le knock-out de IKK ou la surexpression d'I $\kappa$ B provoque une diminution de la synthèse de protéines virales précoces et tardives, ainsi qu'une diminution du titre viral. Le titre diminue d'autant plus que la quantité d'I $\kappa$ B exprimée par un vecteur adénoviral, augmente. Enfin, il faut signaler que certains gènes herpétiques possèdent des sites  $\kappa$ B dans leurs promoteurs, et des expériences ont montré que NF- $\kappa$ B pouvait activer leur transcription, suggérant un rôle direct de NF- $\kappa$ B dans l'expression des gènes viraux (164).



**Figure II : Représentation de la voie NF- $\kappa$ B activée durant l'infection par HSV-1.** La liaison de gD à son récepteur spécifique HveA (aussi nommé HVEM), active NF- $\kappa$ B à travers une voie de signalisation impliquant des protéines TRAF. La deuxième phase d'activation de NF- $\kappa$ B serait dépendante de la synthèse de protéines virales très précoces. L'activation par la PKR est contestée. Les flèches noires représentent la voie d'activation transcriptionnelle par NF- $\kappa$ B. Les flèches vertes représentent les principales synthèses protéiques.

**L'apoptose.** L'infection HSV-1 induit plusieurs réponses cellulaires, comme la réponse immunitaire innée, la réponse apoptotique, la réponse inflammatoire et la réponse au stress. Dans la mesure où les virus oncolytiques que nous avons construits exploitent des différences au niveau de l'apoptose entre cellules saines et cellules cancéreuses, nous ne développerons dans ce chapitre que les réponses anti- et pro-apoptotiques.

Contrairement à la nécrose qui est accidentelle et souvent associée à une maladie, l'apoptose est un phénomène physiologique qui n'est jamais associé à un processus inflammatoire. En effet, la membrane cellulaire ne se rompt pas, évitant ainsi la

libération de toute substance inflammatoire dans le milieu extérieur. L'apoptose implique l'activation d'une série d'événements moléculaires conduisant à la mort de la cellule. Cette mort cellulaire est caractérisée par de nombreuses modifications morphologiques et biochimiques. On observe une condensation à la fois du noyau et du cytoplasme, induisant ainsi une diminution significative du volume cellulaire. Les mitochondries des cellules apoptotiques subissent des modifications majeures : diminution du potentiel membranaire mitochondrial, modification de la perméabilité mitochondriale et rélargage dans le cytosol de molécules apoptogènes. Après la dissipation du potentiel membranaire mitochondrial, les cellules atteignent un point de non-retour. La chromatine se condense et l'ADN se clive en fragments internucléosomiques de 180 à 200 paires de bases (pb) sous l'action d'une endonucléase (CAD/DFF40) (56), engendrant ainsi des extrémités 3'OH sur chaque fragment d'ADN. Finalement, la membrane plasmique va bourgeonner et conduire à la formation de corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme de la cellule. Afin de faciliter la reconnaissance des corps apoptotiques par les phagocytes, la cellule va signaler son état apoptotique grâce à la translocation de la phosphatidylsérine du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique. In vivo, ces corps apoptotiques sont rapidement phagocytés par les macrophages, aboutissant à l'élimination silencieuse de la cellule (57).

Les événements conduisant à la mort de la cellule sont très rapides et se déroulent selon un mécanisme très précis. Le composant central du processus apoptotique est un système protéolytique impliquant une famille de protéases appelées caspases. Les caspases se partagent en deux sous-groupes : les caspases initiatrices et les caspases effectrices (209). Les caspases effectrices sont activées par les caspases initiatrices en cascade et clivent des substrats intracellulaires provoquant la mort cellulaire (41). Durant l'apoptose, de nombreuses protéines comme celles appartenant à la famille des Bcl-2, le cytochrome *c*, et Apaf-1 (apoptosis protéase activation factor-1) sont reliées à la voie des caspases (2, 75, 238).

Quatre voies d'activation des caspases durant l'apoptose ont été identifiées et classées comme suit : (1) la voie mitochondriale ou voie intrinsèque ; (2) la voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque ; (3) la voie du granzyme B ; et (4) la voie du réticulum endoplasmique (RE). Les deux voies principales sont la voie intrinsèque et la voie extrinsèque.

La mitochondrie agit en tant que régulateur central des voies de signalisation de l'apoptose. Les nombreux signaux pro-apoptotiques activés par divers stimuli comme les récepteurs de mort, les agents chimiothérapeutiques, et encore les radiations ionisantes ou UV, convergent vers cet organite cellulaire.

La voie intrinsèque dépend directement de la mitochondrie. Les mitochondries subissent deux changements majeurs durant l'apoptose induite par des agents néoplasiques, les radiations UVs, un déficit des facteurs de croissance, ou des dommages à l'ADN. En premier, la membrane mitochondriale externe devient perméable libérant les protéines se trouvant normalement dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie et notamment le cytochrome *c* mais également d'autres facteurs induisant l'apoptose. En second, le potentiel transmembranaire de la membrane mitochondriale interne est réduit (36). Le relâchement du cytochrome *c* dans le cytoplasme mène à la formation d'un complexe heptamérique capable d'activer les caspases, appelé apoptosome. L'apoptosome est un complexe macromoléculaire composé de cytochrome *c*, de la protéine Apaf-1, de déoxyadénosine triphosphate (dATP), et de procaspase 9. Ce complexe permet l'activation de la caspase 9. La caspase 9 possède un domaine (CARD)

de recrutement des caspases dans sa partie N-terminale, qui joue un rôle important dans son association avec Apaf-1 et le cytochrome *c* (1, 36, 244). A son tour, l'activation de caspase 9 clive les caspases effectrices comme caspase 3, 6, et 7 (159). Ensuite, les caspases effectrices clivent leurs protéines cibles et aboutissent à l'effondrement de la cellule. Dans ce processus apoptotique, caspase 3 et 9 semblent être les plus importantes car leurs activités influent sur le processus apoptotique de même que le type de mort cellulaire (40, 135).

Une autre voie dépendante des caspases, appelée voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort, est celle qui est déclenchée à la surface de la cellule par différents récepteurs membranaires. Les récepteurs de mort, situés à la surface des membranes cellulaires, appartiennent à la famille du récepteur au TNFR (tumor necrosis factor receptor) dont TNFR et Fas sont les mieux caractérisés. Ces récepteurs de mort possèdent dans leur extrémité cytoplasmique des domaines effecteurs de mort (DD), permettant la transmission d'un signal apoptotique via l'activation des caspases (22, 217). Après leur association avec des ligands de mort extracellulaire de la famille TNF (Tumor necrosis factor) tels que TNF $\alpha$  et FasL/CD25L (162, 217) les récepteurs subissent une oligomérisation et/ou un changement de conformation qui leur permet de recruter une protéine associée au domaine de mort du récepteur TNF ou Fas, appelé FADD (Fas-associated death domain) ou TNFADD (TNF receptor-associated death domain). Cette protéine va à son tour recruter des molécules de procaspase 8 (et probablement procaspase 10) et entraîner leur activation en caspase 8 et 10. Ces protéines forment un complexe appelé DISC (death inducing signalling complex) (143). Au niveau du complexe DISC, les caspase 8 et 10 activent les caspases activatrices et notamment la caspase 3 (36). La voie intrinsèque et la voie extrinsèque aboutissent toutes deux à l'activation de la caspase 3. Une fois que la caspase 3 est activée, elle entre dans le noyau et coupe un ensemble de protéines comme PARP-1 (enzyme de réparation d'ADN) et la lamine nucléaire (36). Lorsque PARP-1 est coupée, on observe l'apparition de p85, produit inactif de cette coupure. L'inactivation de PARP-1 par les caspases est donc un marqueur nucléaire de l'avancement du processus apoptotique.

Les deux voies apoptotiques peuvent être reliées par Bid, qui est une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2 (236). Bid se trouve normalement dans le cytosol et est coupée par caspase 8 pour former une protéine tronquée (tBid) qui va être transloquer vers la mitochondrie (121). Dans la mitochondrie, tBid active Bax, initiant le relâchement du cytochrome *c* et le dysfonctionnement de la mitochondrie. Cette communication permet d'amplifier l'activation des caspases nécessaires pour l'apoptose. Enfin, diverses voies de transduction cellulaires participent à la modulation de l'apoptose, notamment celle du facteur de transcription NF $\kappa$ B et certaines voies de stress cellulaire comme, par exemple, JNK (cJun N-terminal Kinase).

L'apoptose en tant que processus de mort programmée est un carrefour décisionnel physiologique. Sa résolution au niveau cellulaire permet le maintien de l'homéostasie au cours du développement embryonnaire et dans de nombreux processus physiologiques de la vie adulte. Suite à l'apoptose, le système immunitaire élimine les cellules apoptotiques dans des conditions non inflammatoires et déclenche une réaction immune spécifique contre les antigènes présents dans les phagosomes.

### C. L'infection par HSV-1 a des effets pro- et anti-apoptotiques.

La balance entre ces deux effets semble dépendante du type cellulaire. Les cellules du système immunitaire peuvent mourir d'une apoptose induite par HSV-1 tandis que d'autres types cellulaires possèdent les moyens de réprimer cette apoptose. Dans la lignée de cellules macrophages RAW264.7, l'infection avec le virus sauvage induit un degré modeste mais reproductible d'apoptose (10). Les cellules Jurkat (T-cell leukemia line) et des cellules CD4+ isolées à partir de sang périphériques subissent une apoptose après contact avec le virus HSV-2. L'activation de cette apoptose est décrite comme étant à la fois dépendante de la voie extrinsèque (récepteur de mort) mais aussi intrinsèque (mitochondriale) (76). Les cellules de la microglie infectées n'autorisent pas la multiplication du virus et libèrent des cytokines pro-inflammatoires, induisant la mort cellulaire. La réponse immune est différente dans les astrocytes infectés qui sont permissifs à un cycle de multiplication lytique. L'apoptose est présente dans ces deux types cellulaires et est induite aussi bien par la voie extrinsèque que par la voie intrinsèque. La voie de signalisation TNF est la voie dominante pour les cellules de la microglie, la voie FAS est la voie dominante pour les astrocytes (7). Ces résultats mettent en évidence une corrélation entre le déroulement de l'apoptose et la réponse immune engendrés par l'infection HSV-1.

Cependant, la plupart des cellules infectées par HSV-1 ne meurent pas d'un processus apoptotique. L'induction d'un processus apoptotique au cours de l'infection herpétique fut déduite des résultats d'expériences utilisant des souches d'HSV-1 qui n'exprimaient pas de protéines virales très précoces à cause de l'absence du gène correspondant, de leur inactivation, ou par inhibition de leur expression. Dans tous ces cas, l'infection ne dépasse pas la phase très précoce du cycle lytique et laisse apparaître des phénomènes apoptotiques qui ne sont pas observés lors d'une infection par un virus sauvage, qui développe un cycle lytique, suggérant que l'infection virale d'abord induit et ensuite réprime l'apoptose de la cellule hôte.

Une première étude illustre, au niveau morphologique, les concepts d'induction et de répression de l'apoptose par HSV-1 (65). Les auteurs ont réalisé une étude comparative de l'infection de neurones par un virus sauvage et par un virus inactivé par un traitement aux rayons ultraviolets (UV). Ce virus peut infecter les cellules et relâcher son génome dans le noyau, mais son ADN ne sera pas exprimé car trop endommagé. Dès la première heure post-infection, les deux infections révèlent une diminution du potentiel de membrane des mitochondries et une augmentation de leur volume, ainsi que l'inversion des phosphatidylsérines à la surface de la membrane plasmique. Les auteurs remarquent aussi une activation de la caspase 8, ce qui pourrait signifier une implication des récepteurs de mort dans l'induction. Ces changements morphologiques, caractéristiques de l'apoptose, reviennent à leur état initial vers 3 hpi pour l'infection par le virus sauvage, mais persistent avec le virus irradié et, à 24 hpi, on observe dans ce dernier cas un noyau de taille réduite et une chromatine compactée, typique de l'apoptose tardive. Les deux virus induisent donc une réponse apoptotique, mais le virus inactivé ne possède pas les moyens de la réprimer. Cette étude suggère, par ailleurs, que le facteur déclenchant l'apoptose serait un élément de la structure virale.

La notion d'un élément inducteur structural, apporté par le virus infectant, est suggérée aussi par l'infection avec un mutant, HSV-1tsB7, qui ne peut pas relâcher son génome dans le noyau cellulaire à la température non permissive de 39,5°C. À cette

température, ce virus provoque l'apoptose dans les cellules VERO, mais pas dans les cellules nerveuses SK-N-SH ni dans les cellules de carcinome épidermoïde HEp-2 (62).

Cependant, d'autres expériences suggèrent que l'expression du génome viral est requise pour qu'il y ait induction du processus d'apoptose (12, 185). Ainsi, en présence de l'actinomycine D, un inhibiteur de la transcription, l'infection de cellules HEp-2 par HSV-1 n'induit pas d'apoptose. Par contre, en présence de cycloheximide (CHX), un inhibiteur de la synthèse protéique, HSV-1 induit l'apoptose à travers un processus qui implique l'activation de la caspase 3 et la dégradation de PARP. L'hypothèse qui se dégage dans ce cas est donc que la transcription des gènes  $\alpha$  suffirait à déclencher l'apoptose. L'induction serait un événement nécessitant la transcription des gènes  $\alpha$  mais antérieur à la synthèse protéique virale. Ces inducteurs potentiels pourraient être les molécules d'ARN par elle-mêmes, les processus de maturation de l'ARN, le transport hors du noyau ou l'initiation de la traduction.

Enfin, d'autres études suggèrent la nécessité d'une synthèse de protéines pour le déclenchement du processus apoptotique. Ainsi, dans des cellules VERO infectées par un virus délété du gène codant la protéine très précoce ICP4 ( $\Delta$ ICP4), les marqueurs spécifiques de l'apoptose apparaissent plus tardivement que dans les cellules HEp-2 (158). En traitant les cellules à la CHX, les auteurs montrent que l'apoptose induite par ce virus dans les cellules VERO nécessite une synthèse de protéines cellulaires et virales avant 3 hpi, contrairement à l'apoptose induite dans les cellules HEp-2 par ce même mutant. Divers paramètres caractéristiques de la cellule infectée peuvent indirectement participer à l'induction ou à l'entretien du processus apoptotique. Ainsi, ICP0 est une protéine virale qui semble favoriser le développement de l'apoptose en empêchant l'accumulation stable des facteurs de réparation de l'ADN (123, 185).

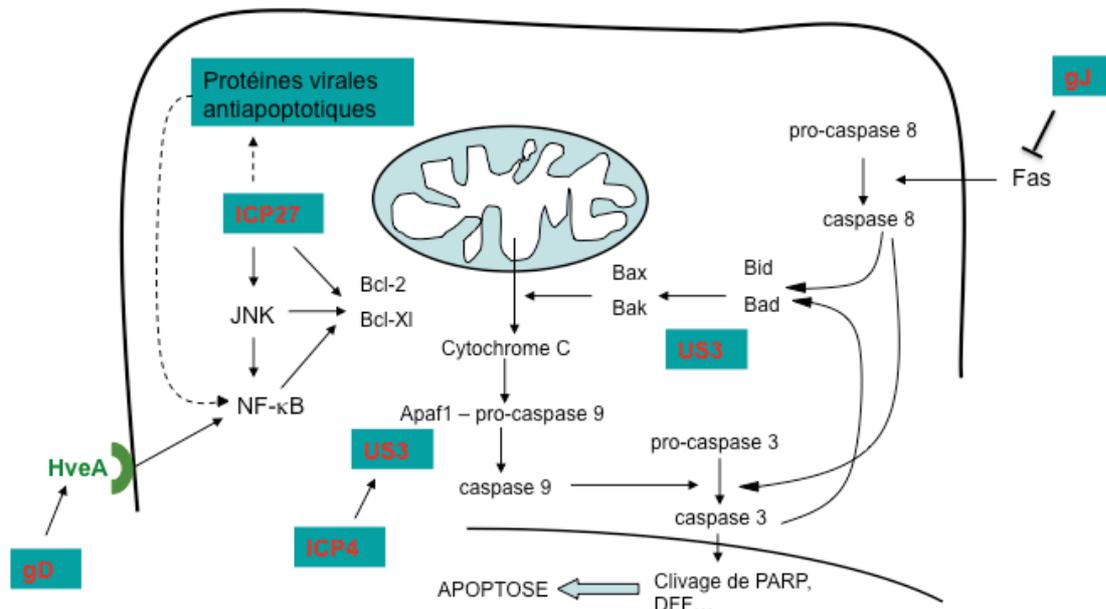
Il est à noter que deux études décrivent une mort apoptotique, induite par HSV-1, qui pourrait être indépendante des caspases. En effet, une équipe montre que la fragmentation de l'ADN dans des cellules SK-N-SH infectées par HSV-1 $\Delta$ ICP4 ne peut pas être bloquée par l'inhibiteur général des caspases z-VAD-fmk (13, 62). Par ailleurs, une autre étude rapporte que, lors d'infections par ce même virus de fibroblastes de poumon embryonnaire humain (HEL), la molécule AIF (apoptosis inducing factor), impliquée dans des phénomènes d'apoptose indépendante des caspases, migre de la mitochondrie vers le noyau (243).

Les expériences décrites dans ce chapitre montrent donc que l'infection herpétique peut déclencher un processus apoptotique, qui est généralement considéré comme une réponse de défense cellulaire visant à empêcher la multiplication virale. On ne connaît pas la nature moléculaire précise des facteurs inducteurs, mais les résultats suggèrent que l'induction peut se produire à différentes étapes précoces de l'infection et implique des éléments structuraux du virus entrant et/ou des phénomènes dépendants d'une synthèse *de novo* d'ARN et parfois de protéines. Il ressort également de ces études que le facteur inducteur peut varier en fonction du type cellulaire infecté et de la souche virale utilisée. La répression de l'apoptose, qui sera abordée dans le prochain chapitre, est aussi tributaire de ces paramètres.

**L'apoptose est inhibée par le virus.** Plusieurs équipes ont mis en évidence une activité anti-apoptotique d'HSV-1 en infectant des cellules induites en apoptose par des agents exogènes. Ainsi, HSV-1 protège les cellules SK-N-SH contre l'apoptose induite par l'activation des récepteurs TNF $\alpha$ , Fas et C2-céramide par leurs ligands naturels. HSV-1 est également capable d'empêcher l'apoptose induite par des chocs osmotiques ou par des chocs thermiques (62, 109). La capacité de ce virus à bloquer l'apoptose induite par

divers facteurs exogènes non viraux, indique que des produits de gènes viraux agissent sur de multiples produits cellulaires impliqués dans les voies conduisant à l'apoptose. Ces expériences laissent présager de la diversité des moyens développés par le virus pour inhiber les mécanismes apoptotiques induits par l'infection elle-même, afin de lui permettre de terminer son cycle de réplication dans différents types cellulaires. En effet, plusieurs expériences montrent que certains traitements anti-apoptotiques améliorent l'efficacité de la multiplication de certains mutants herpétiques (12, 109).

Une approche cinétique du pouvoir anti-apoptotique d'HSV-1 (12, 14, 109), a permis de situer dans le temps l'expression des gènes viraux responsables de cette activité inhibitrice. Des cellules HEp-2, infectées avec un virus HSV-1 sauvage, ont été traitées à la CHX à 1, 3, 6, 8 ou 12 hpi (12). Les cellules infectées, traitées à la CHX dès le début de l'infection et jusqu'à 3 hpi, meurent par apoptose. Les cellules traitées entre 3 et 6 hpi par contre, deviennent progressivement résistantes à l'apoptose et, dans les traitements plus tardifs, tous les marqueurs d'apoptose disparaissent. Les auteurs en déduisent que la répression de l'apoptose nécessite la synthèse de protéines, virales ou cellulaires, entre 3 et 6 heures après le début de l'infection. En présence d'acide phosphonoacétique (PAA), un inhibiteur spécifique de la réplication de l'ADN viral, on constate toujours l'effet anti-apoptotique d'HSV-1, montrant que l'expression des gènes impliqués ne nécessite pas de réplication de l'ADN viral (12, 109). La plage de temps nécessaire à la répression de l'apoptose correspond donc à l'expression des gènes viraux  $\beta$  ou  $\gamma$ 1. Les gènes viraux porteurs des fonctions anti-apoptotiques ont été essentiellement étudiés grâce à l'analyse de mutants de délétion. Les gènes qui ont été identifiés jusqu'à présent codent pour les protéines  $\alpha$  ICP4 (120) et ICP27 (9), la protéine  $\beta$  US3 (89) et les glycoprotéines J et D (gJ, gD) (89) (voir figure II).



**Figure III : Modèle de la participation de protéines virales et cellulaires dans la répression de l'apoptose par HSV-1.** Les protéines virales, en rouge, sont indiquées au niveau de leur principale action dans le processus apoptotique caspase dépendant. ICP27 active JNK et stabilise Bcl-2 mais pourrait aussi avoir un rôle anti-apoptotique en favorisant l'expression de certaines protéines virales précoces. Us3 agit à deux niveaux différents sur la voie mitochondriale de l'apoptose (voir figure III). Le mécanisme anti-apoptotique de la protéine de membrane gJ est mal connu mais on sait qu'elle protège

de l'apoptose induite par le ligand Fas. gD active la protéine anti-apoptotique NF- $\kappa$ B suite à son interaction avec le récepteur HveA (HVEM).

### **Fonctions virales impliqués dans le contrôle de l'apoptose**

**ICP4.** Une première étude a montré une induction de l'apoptose dans des cellules VERO infectées par un virus HSV-1 délété du gène codant pour la protéine ICP4 (120) un facteur de transcription viral très précoce. A 20 hpi, des changements morphologiques et biochimiques caractéristiques de l'apoptose, tels qu'un noyau de taille réduite et une fragmentation de l'ADN, sont visibles dans des cellules infectées par HSV-1 $\Delta$ ICP4, mais pas avec le virus sauvage. Ceci suggère qu'ICP4, ou une protéine synthétisée suite à l'activité transactivatrice d'ICP4, est capable de protéger la cellule contre l'apoptose. Dans la mesure où ICP4 est un facteur de transcription qui n'agit que sur le génome viral et ne modifie pas l'expression des gènes cellulaires, on considère que cette protéine agit indirectement, essentiellement grâce à son rôle transactivateur de l'expression des gènes viraux plus tardifs, et notamment la protéine Us3 comme nous verrons par la suite (9, 65) (figure III). ICP4 est également impliquée dans la stabilité du génome virale. La demi-vie du génome HSV-1 dans la cellule infectée, en l'absence de réplication est d'environ 24 heures. La stabilité du génome d'un virus délété d'ICP4, ne contrôlant donc pas l'apoptose, dure en moyenne 8 heures (200).

**ICP27.** Une autre équipe (12) a utilisé la même approche expérimentale, mais en privant le virus du gène codant pour la protéine ICP27 (HSV-1 $\Delta$ ICP27), qui est un facteur de régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique virale et cellulaire. L'apoptose induite par ce virus a été évaluée sur des paramètres morphologiques, ainsi que sur le clivage des enzymes PARP, DFF et l'activation de la caspase 3. Des changements morphologiques, ainsi que la fragmentation de l'ADN génomique, sont observés dès 12 hpi sur des cellules HEp-2. Le virus  $\Delta$ ICP27 est donc incapable d'empêcher l'apoptose induite par l'infection. En utilisant une série de mutants d'ICP27, cette étude a permis d'identifier des régions d'ICP27 essentielles à la prévention de l'apoptose (14). Ces analyses montrent qu'il existe une très forte corrélation entre la capacité d'ICP27 à stimuler la production de protéines virales  $\beta$  et  $\gamma$ 1 et la capacité à réprimer l'apoptose (figure III). Ainsi, ces résultats suggèrent qu'ICP27 agirait indirectement, en stimulant la maturation d'un ou plusieurs répresseurs plus tardifs de l'apoptose. À l'aide de mutants ponctuels d'ICP27, les auteurs ont observé une modulation quantitative de l'apoptose, mise en évidence par une augmentation progressive de la condensation de la chromatine (14). Ainsi, une région concernant les acides aminés (Aa) 139 à 153 dans l'extrémité N terminale d'ICP27 pourrait fonctionner en régulant la balance entre facteurs pro et anti-apoptotiques. Ceci suggère la notion d'un équilibre entre la réponse pro-apoptotique de la cellule d'une part, et les fonctions anti-apoptotiques induites par HSV-1 d'autre part.

Outre son action sur l'expression des gènes viraux, le groupe de Bachenheimer a décrit l'implication d'ICP27 dans l'activation des protéines kinases de stress JNK et p38 (78). L'augmentation de l'activité kinase de JNK et p38 dans des cellules infectées avec un virus sauvage débute à partir de 3 hpi. Cette augmentation de l'activité kinase est présente tout au long du cycle viral, avec un maximum entre 6 et 8 hpi, et requiert un domaine de la protéine ICP27 situé dans l'extrémité N-terminale, entre les Aa 12 et 63. On sait que l'apoptose est régulée en partie par la phosphorylation de membres de la

famille Bcl-2 au moyen de la voie JNK (106). Ceci suggère que l'activation de JNK et p38 par ICP27 pourrait arrêter la progression à la fois du cycle cellulaire et de l'apoptose durant l'infection HSV-1 (voir figure II). Enfin, deux études montrent que l'absence d'ICP27 est corrélée, d'une part avec une dégradation de la protéine Bcl-2 par des caspases et, d'autre part, à une diminution de la stabilité de l'ARNm de Bcl-2 (78, 240).

**Glycoprotéine J.** La délétion du gène Us5, codant la glycoprotéine J (gJ) réduit de façon marquée l'inhibition de l'apoptose induite par le ligand Fas et réduit partiellement l'inhibition de l'apoptose induite par les UV. Inversement un virus privé du gène Us3 inhibe de façon marquée l'apoptose induite par UV et inhibe partiellement l'apoptose induite par Fas (figure III). Il est donc possible que les produits des gènes Us3 et Us5 coopèrent pour inhiber l'activation des caspases 3 et 8 impliquées dans une voie d'apoptose commune à Fas et aux UV (89). Par ailleurs, la gJ, exprimée dans des cellules subissant un traitement Fas, ou incubées avec la granzyme B, inhibe l'apoptose provoquée par cette enzyme, ainsi que l'activation de la caspase 3 (88). Aubert et al (10) montrent que la protéine tardive gJ inhibe l'apoptose. Son expression corrèle avec la fin de la « fenêtre de prévention ». Cette expression, initialement proposée par John Blaho, définit la période pendant laquelle s'exprime l'activité antiapoptotique virale. Lors d'une infection HSV-1 à forte m.o.i. de cellules VERO, la fenêtre de prévention a été située par cet auteur entre 3 et 6 hpi. Les résultats suggèrent également que l'inhibition de l'apoptose par gJ serait indépendante de la consommation d'ATP. gJ partage avec gD le fait de protéger la cellule infectée de l'apoptose (242) mettant ainsi en évidence des fonctions partagées entre différentes protéines virales.

**Glycoprotéine D.** Roizman et collaborateurs ont montré que la gD pouvait bloquer l'apoptose et que cette glycoprotéine devait être présente dans l'enveloppe du virus infectant pour exercer une telle activité (242). D'autres équipes ont montré que la gD pouvait protéger les cellules contre la mort apoptotique dépendante de FAS, et que le facteur de transcription NFκB jouait un rôle dans l'inhibition de l'apoptose (143). Ces résultats suggéraient en même temps que l'interaction de la gD avec son récepteur HVEM, exprimé à la surface de la cellule, pouvait être responsable de l'activation de NFκB (figure III). Enfin, il a été plus récemment montré que l'inhibition de l'interaction entre gD et le récepteur HVEM, en utilisant des anticorps monoclonaux, réduisait de manière significative la protection par la gD contre l'apoptose dépendante de FAS. L'ensemble de ces résultats suggère que l'interaction entre la gD, apportée par les particules virales, et le récepteur HVEM, exprimé à la surface des cellules, entraîne d'abord l'activation de NFκB et ensuite l'inhibition de l'apoptose induite par FAS (189).

**Us3.** Cette protéine est également antiapoptotique. C'est une des trois protéines kinase codées par le virus HSV-1. Son activité kinase lui permet de remplir de nombreux rôles au sein de la cellule infectée. En ce sens, elle est une protéine emblématique des protéines multifonctions codées par le génome HSV-1. Son cas sera traité dans le chapitre suivant.

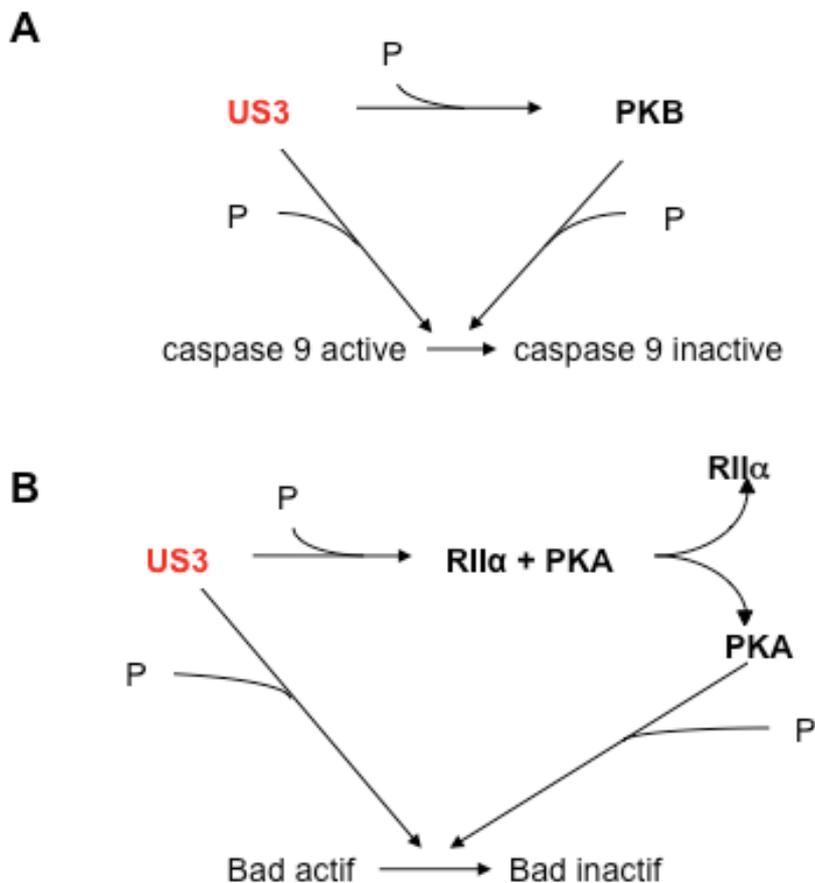
#### **D. Les différents rôles de la protéine virale Us3**

Le gène Us3 code pour une sérine/thréonine protéine kinase. Les sites phosphorylés par cette kinase présentent une séquence de type (R)nX(S/T)YY où n=3, X peut être Arg, Ala, Val, Pro ou Ser et Y tout Aa non acide. La protéine Us3 est capable de s'autophosphoryler

pour moduler son activité kinase (183). Elle phosphoryle également de nombreux substrats cellulaires et viraux (99) tels que les protéines virales codées par les gènes UL34 (175, 176) ou UL13 (46), permet la localisation de différentes protéines telles que UL31 et UL34 (178) et exerce plusieurs fonctions, soit directement soit indirectement, via les protéines virales et cellulaires qu'elle phosphoryle au cours de l'infection par HSV-1. La fonction la plus étudiée à ce jour est la fonction anti-apoptotique.

La protéine Us3, exprimée par un baculovirus, bloque la libération du cytochrome C et le clivage des procaspases 3 et 9, induites dans des cellules infectées par un mutant HSV-1- $\Delta$ Us3 (33, 154). Elle bloque aussi l'activation de la caspase 3 induite par un virus  $\Delta$ ICP4 dans des cellules HEp-2, suggérant que la fonction antiapoptotique d'ICP4 passe par l'action de la protéine Us3 (17). US3 agit au niveau mitochondrial et les protéines de la famille Bcl-2 semblent être ses partenaires privilégiés (figure III). Au cours du processus apoptotique, le clivage caspase-dépendant de Bad ou de Bid stimule leur capacité à activer la protéine pro-apoptotique Bax (ou Bak). Outre ce clivage, l'activité de Bad peut être régulée par phosphorylation de la ser112 par la RSK (*Ras-mitogen-activated protein kinase*), de la Ser136, par la protéine kinase B (PKB), et de la Ser155 par la protéine kinase A (PKA). Bad est activée par déphosphorylation et interagit avec Bcl-2. Ceci entraîne la libération de Bax du complexe Bcl-2:Bax et permet à Bax de former un homodimère qui lyse la membrane mitochondriale. La protéine Bid, par contre, lie Bax directement et l'active en provoquant un changement de conformation. Cependant, bien que l'expression d'Us3 corrèle avec la phosphorylation de Bad, il n'existe aucune évidence solide d'une phosphorylation directe de Bad par Us3 (33). De plus, Us3 bloque aussi l'apoptose induite par un mutant de Bad non phosphorylable, suggérant que la phosphorylation de Bad n'est pas nécessaire pour l'inhibition de l'apoptose par Us3. D'autre part, l'activité d'Us3 est également suffisante pour bloquer l'apoptose induite par une surexpression de Bid ou de Bax (17, 33).

Trois mécanismes dépendants de l'activité kinase d'Us3 pourraient expliquer son activité anti-apoptotique. Le mécanisme principal d'inhibition de l'apoptose fait intervenir Us3 dans l'inhibition du clivage de Bad par la caspase 3, elle-même, activée par la caspase 9 (figure IV). En effet, la caspase 3 peut activer par clivage la protéine Bad et ainsi provoquer un renforcement de la réponse apoptotique dépendant de la mitochondrie. La PKB inactive la caspase 9 en la phosphorylant sur sa sérine 196. Un site consensus Us3 très fort est présent de part et d'autre de cette sérine (161), suggérant qu'Us3 pourrait agir seule, ou via PKB, pour inactiver la caspase 9 et éviter l'activation subséquente de Bad par la caspase 3. Deuxièmement, Benetti *et al*, montrent qu'une activation de la PKA inhibe l'apoptose induite par HSV-1- $\Delta$ ICP4 ou par des protéines cellulaires pro-apoptotiques et mettent en évidence une phosphorylation par US3 de la sous-unité régulatrice RII $\alpha$  de la PKA, modification qui a comme conséquence l'activation de la PKA (18, 19). Par ailleurs, la PKA phosphoryle une sérine/thréonine dans un contexte très semblable à celui reconnu par Us3. Ces données suggèrent qu'Us3 pourrait bloquer l'apoptose soit seule, en phosphorylant des substrats de la PKA, soit en activant la PKA qui phosphoryle à son tour plusieurs protéines, dont Bad (figure III). Enfin, un troisième mécanisme encore mal défini propose qu'Us3 favorise un clivage particulier de Bad sur un site proche de l'extrémité carboxyle. Ce clivage inactiverait la fonction pro-apoptotique de Bad (17). Us3 diminue l'activation de la voie JNK, activée par HSV-1 et ainsi participerait au contrôle de l'apoptose dans les cellules nerveuses (148).



**Figure IV : A. Inactivation de la caspase 9** par phosphorylation de la Ser196. Us3 pourrait phosphoryler directement la caspase 9 ou pourrait activer PKB qui pourrait alors phosphoryler la caspase 9. **B. Inactivation de Bad** par phosphorylation de la Ser155. Comme dans A), Us3 pourrait agir directement ou indirectement via l'activation de la PKA.

Mis à part son rôle antiapoptotique, Us3 participe également au contrôle de la réponse antivirale innée. Piroozmand et ses collaborateurs (173) démontrent un rôle d'Us3 dans la résistance du virus à la réponse interféron. Un traitement par l'interféron de cellules infectées par un virus délété du gène Us3 a pour conséquence une diminution de la production de virions et une diminution de l'effet cytopathogène par rapport à l'infection par le virus sauvage. Ces diminutions sont d'autant plus évidentes que la m.o.i. serait faible. De plus, la taille et le nombre des plages de lyse sont significativement réduits au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration en interféron par comparaison avec le virus sauvage.

Us3 bloque également l'expression des gènes dépendants de l'IFN $\gamma$  en modifiant le récepteur  $\alpha$  de l'IFN $\gamma$  (122). Les toll like récepteurs (TLR) sont activés par l'infection HSV-1. Les TLR2 et 9 sont impliqués en particulier dans l'initiation de la réponse innée anti HSV-1. TLR 3 est aussi impliqué dans la défense du système nerveux central contre une infection sévère par HSV-1. Une étude de Peri et ses collaborateurs montre que l'infection de monocytes par un virus délété d'ICP4 et d'Us3 induit une mort par apoptose ainsi qu'une augmentation de la synthèse des ARNm de TLR3 et d'IFN de type I

mais pas de changement de la synthèse des ARNm de TLR2 et 9 par rapport à l'infection avec une souche sauvage (172). Us3 participe aussi à l'échappement de la réponse immunitaire adaptative, sans modifier les fonctions de présentation des antigènes (32, 34). Les cellules infectées envoient un signal d'inactivation aux lymphocytes. Les lymphocytes T inactivés sont incapables de relâcher leurs granules cytotoxiques ainsi que les cytokines de l'inflammation. Cette inactivation requiert la présence des TCR et de la protéine Us3. Les lymphocytes T inactivés ne sont pas apoptotiques et leur état est réversible suite à une stimulation avec des esters de phorbol (11, 195).

Us3 contribue aussi à modifier l'architecture cellulaire, en particulier le noyau. Cette fonction favorise la réplication de l'ADN viral dans le noyau ainsi que la maturation et la migration des virions à l'intérieur de la cellule. Us3 favorise la création d'un complexe protéique formé par les protéines UL34 et UL31, situé au niveau de la membrane interne du noyau. Ces deux protéines, phosphorylées par Us3, participent à l'enveloppement des nucléocapsides (150-152, 178, 228) (100, 179, 182). Us3 augmente la phosphorylation de la lamine B et induit l'activation et le recrutement de la PKC près de la membrane interne du noyau (166). Les protéines Us3 et UL34 agissent de manière antagoniste pour réguler l'état du réseau de lamine nucléaire afin de favoriser la maturation et la migration des virions mais également d'éviter l'induction de l'apoptose suite à une trop forte perturbation du réseau de lamine (20). Us3 modifie également le réseau de la protéine Emerine, qui soutient la membrane nucléaire interne. Cette altération architecturale est également suspectée de favoriser la migration des nucléocapsides (113, 149). La protéine essentielle de matrice nucléaire Matriline-3 possède un site de phosphorylation spécifique d'Us3. L'infection par HSV-1 induit une relocalisation de matriline-3 dépendante d'Us3 vers le noyau dont elle pourrait changer l'architecture pour favoriser l'infection (113).

Us3 se localise au niveau de la mitochondrie et modifie de façon drastique le métabolisme cellulaire en induisant la suppression de la respiration mitochondriale (51). Enfin, une étude comparative du transcriptome de cellules infectées par HSV-1 sauvage ou par une souche HSV-1 $\Delta$ Us3 permet d'avoir une vision d'ensemble des nombreuses modifications induites par Us3 dans la cellule infectée (93).

De par l'ensemble de ses fonctions, la protéine Us3 participe à la virulence. Sa non-expression ou des mutations affectant son activité kinase induisent une diminution de la réplication virale et réduisent l'importance des lésions de kératite et périoculaire dans un modèle murin (183). Le dernier substrat mis en évidence de la protéine Us3 est la glycoprotéine B (gB). Us3 régule la localisation de la gB à la surface de la cellule infectée (98). Une mutation de la gB ne permettant plus sa phosphorylation par Us3 provoque une diminution de la réplication virale ainsi qu'une réduction des symptômes cliniques dans un modèle murin de kératite à HSV-1 (86). La réplication du virus HSV-1 peut également être réduite de manière dose dépendante par la molécule antivirale D609 qui inhibe l'activité d'Us3 (223).

## **2. LES HEPATOCARCINOMES**

Le chapitre suivant aborde brièvement quelques aspects sanitaires et cliniques du traitement des HCC. Je me focaliserai sur la description moléculaire de cette maladie complexe en décrivant les gènes, les protéines, et les voies de signalisation qui transforment les cellules du foie en cellules tumorales. Pour rester dans la perspective générale de cette thèse, j'ai tenu à souligner plus particulièrement les éléments pouvant être utilisés ou concernés par l'infection oncolytique tel que certaines voies de signalisation impliquées dans le contrôle de l'apoptose, le microenvironnement cellulaire et le système immunitaire.

### **A. Epidémiologie**

Le carcinome hépatocellulaire est le cinquième cancer le plus fréquent dans le monde, le troisième plus mortel et le plus fréquent des cancers primitifs du foie. On recense environ 5 000 nouveaux cas par an en France, avec une tendance à l'augmentation, notamment en raison du nombre croissant de cas d'hépatite chronique. L'épidémiologie des HCC montrent plusieurs facteurs de risque dont les principaux sont : les hépatites B et C (202) (l'infection par HBV ou HCV est la cause de 75% des HCC), la cirrhose alcoolique, l'aflatoxine B1, l'obésité et le diabète (29). L'importance des différentes étiologies varie selon la zone géographique. Le ratio femme/homme de 1/3 est expliqué en partie par le fait que l'inflammation, facteur de risque des HCC, est diminuée chez les femmes grâce à l'action négative des œstrogènes sur la sécrétion d'interleukine 6 par les cellules de Kupffer (174).

### **B. Diagnostique et traitement**

Les études de biopsies humaines et modèles animaux permettent de dresser une chronologie partielle de la cancérisation. L'évolution du cancer apparaît ainsi divisée en étapes qui procèdent de l'acquisition d'une mutation. La corrélation entre ces modifications génétiques et les résultats de l'anamnèse et de l'examen clinique classique (état général, nombre et répartition des tumeurs, marqueurs sériques ou génétiques, histologie...etc) est à la base de la construction des systèmes de classification cliniques actuellement utilisés pour le choix d'une stratégie thérapeutique.

Les données de l'anamnèse, de l'examen clinique et les résultats d'examens de base associés au cas clinique, sont confrontées sur un large panel de patients, traitées statistiquement et assemblées afin de déterminer une valeur pronostique attachée à un stade clinique. Les paramètres génomiques du patient sont progressivement introduits et plusieurs systèmes de classification des malades ont été proposés. Ainsi, le BCLC « Barcelona Clinic Liver Cancer staging system » est devenu un des systèmes les plus utilisés pour choisir la stratégie thérapeutique la plus appropriée à un état clinique. Le « Milan criteria » est le score clinique le plus utilisé pour déterminer les patients candidats à une greffe de foie (HCC<5cm ou 3 nodules < 3cm).

Les traitements disponibles incluent la résection chirurgicale, la transplantation hépatique, les thérapies ablatives locales, la chémo-embolisation et radio-embolisation transarterielle, et les thérapies moléculaires (237). Les thérapies ablatives, incluant l'injection d'éthanol et l'ablation thermique, ne sont utilisables que sur des tumeurs localisées et permettent une espérance de vie de 3 ans pour des patients modérément atteints, dans seulement 10% des cas (203). La transplantation hépatique sur des

patients sélectionnés selon le « Milan criteria » atteint une survie à 4 ans post-opération dans 83% des cas (139). La chimiothérapie apporte aussi un traitement supplémentaire depuis que le sorafenib (cf. page 26) a démontré sa capacité à ralentir le taux de progression et à augmenter le taux de survie de patients à un stade avancé de la maladie (130). Les associations thérapeutiques peuvent concerner plusieurs chimiothérapies ou la chimiothérapie et des traitements chirurgicaux locaux.

### **C. Biologie générale des HCC**

Du point de vue anatomique, le foie est un organe richement vascularisé, bénéficiant d'une double irrigation. Il est situé dans la cavité intra péritonéale, entouré par la capsule de Glisson. La machinerie enzymatique des hépatocytes est impliquée dans deux grands processus physiologiques : la détoxification et le métabolisme énergétique du glucose. La détérioration des fonctions hépatiques participe à la gravité du tableau clinique, notamment à cause de la diminution des capacités de détoxification de l'organisme et rend l'efficacité d'un traitement anticancéreux plus difficile à évaluer cliniquement.

Le HCC se développe fréquemment dans un contexte d'inflammation chronique due à des atteintes du métabolisme, des infections virales, un stress toxique ou une réaction auto-immune. Le HCC est considéré comme un modèle particulièrement adapté à l'étude des liens entre cancer et inflammation. L'état anatomo-pathologique le plus fréquemment et communément associé à l'hépatocarcinogénèse est la cirrhose, qui se développe après une longue période (20-40 ans) de maladie hépatique chronique. On reconnaît que les divisions cellulaires dans ces conditions de stress permettent, plus facilement que dans un tissu sain, l'accumulation de modifications génétiques et épigénétiques aboutissant à la transformation de la cellule. De plus, la persistance de génomes de virus hépatiques ou leur insertion, dans le cas d'HBV, peuvent déréguler la machinerie cellulaire et induire de l'instabilité génique. L'hépatocarcinogénèse reste un phénomène peu compris mais l'étude moléculaire entreprise actuellement par de nombreux laboratoires ouvre une fenêtre sur l'enchaînement des événements qui transforment les cellules hépatiques en cellules cancéreuses.

L'origine cellulaire des HCC est sujette à débat. On ne connaît pas précisément le type de cellules hépatiques saines à l'origine de la cellule cancéreuse (cellules matures, hépatocytes, progenitor/stem cells). La cellule cancéreuse possédant des propriétés communes avec les cellules souches, le modèle des cellules souches cancéreuses (cancer stem cells, CSC) est utilisé pour schématiser les divisions cellulaires aboutissant à la formation de la masse cancéreuse. La cellule souche cancéreuse pourrait dès lors être une cellule souche saine transformée en cellule maligne. Ce modèle semble l'emporter aujourd'hui sur le modèle précédent de la dédifférenciation de cellules matures. Selon ce concept, la CSC évolue vers une cellule cancéreuse de plus en plus différenciée et se renouvelle éventuellement par division asymétrique. Elle pourrait également se modifier génétiquement et épigénétiquement au cours de ces processus pour donner une tumeur plus agressive. L'absence de preuves expérimentales ne permet pas de déterminer si les cellules cancéreuses différenciées peuvent réacquérir des propriétés de cellules souches. Ce paradigme de la cellule souche cancéreuse suggère que la destruction des cellules cancéreuses est nécessaire pour sauver un organisme atteint.

Dans le contexte d'une maladie hépatique chronique, la destruction constante des cellules nécessite la multiplication des cellules génitrices. De plus, l'inflammation et divers facteurs viraux ou chimiques induisent un stress cellulaire. Ces deux processus imposent une pression constante sur les différents mécanismes physiologiques de sénescence cellulaire qui évitent l'apparition d'une cellule maligne.

Le taux de renouvellement important accélère le processus physiologique de sénescence qui contrôle les capacités de prolifération des cellules somatiques (raccourcissement des télomères – sénescence réplivative). Chez l'adulte sain, l'absence d'activité télomérase entraîne un raccourcissement des télomères au fur et à mesure des divisions cellulaires successives. Ce raccourcissement au cours de la vie est contrôlé et n'atteint pas un niveau pouvant induire une dysfonction des télomères et une réponse liée aux dommages de l'ADN. Dans le cas d'une maladie hépatique chronique, la perte des télomères est accélérée pour atteindre un niveau maximum dans le foie cirrhotique. La sénescence réplivative est un processus d'arrêt de la prolifération cellulaire présent dans 20% des foies sains, 50% des cas d'hépatite chronique, et atteint 60% des foies touchés par un HCC (165).

Les différents stress cellulaires (cassure de l'ADN, ROS, facteurs viraux) induisent des processus de sénescence indépendants du raccourcissement des télomères. Dans ces cas, il s'agit de « ROS induced senescence » (RIS) et d' « oncogene induced sénescence » (OIS). La production de radicaux libres provoque des dommages de l'ADN. Elle est favorisée dans les cas de maladie chronique du foie par l'inflammation chronique, le stress oxydatif, la mort cellulaire, et d'autres facteurs étiologiques tel que l'hépatite C ou le dysfonctionnement mitochondrial induit par la consommation d'alcool (192). L'OIS est une réponse aux dommages de l'ADN provoqué par l'hyper réplification de l'ADN (53) et pouvant impliquer l'activation de voies de signalisation oncogéniques (Ras, c-myc ou Wnt/ $\beta$ -catenin). RIS et OIS sont deux formes de réponse aux dommages de l'ADN et provoquent l'activation des voies de signalisation ATM/Chk/p53 et p16<sup>INK4a</sup>/pRB, impliquées dans le contrôle de la réponse aux dommages de l'ADN et au contrôle du cycle cellulaire.

Les différentes formes de sénescence représentent une barrière physiologique de protection des tissus et de l'organisme. Bien que la sénescence ne soit pas encore clairement expliquée pour les hépatocytes, le modèle de l'hépatocarcinogénèse propose que cet état physio-pathologique précède l'apparition d'un HCC. L'état de sénescence est principalement contrôlé aux points de passage p53/p21 et p16/pRB. Quand ces points de contrôle ne sont plus actifs, les cellules peuvent se soustraire au processus de sénescence et entrer de nouveau dans un cycle de multiplication cellulaire et d'hyper réplification de l'ADN dans un contexte d'immortalité provoqué par la réactivation de l'activité télomérase et l'instabilité génétique. La cellule acquiert ensuite des modifications génétiques et épigénétiques pour devenir une cellule cancéreuse.

#### **D. Caractérisation moléculaire des HCC**

La formation des HCC s'explique, comme pour toutes les tumeurs, par l'accumulation de mutations (modèle de Weinberg) affectant les processus de contrôle de la prolifération cellulaire et de l'intégrité génétique. Les mutations génétiques, en affectant ces systèmes de contrôle, confèrent à la cellule tumorale une indépendance et des capacités d'échappement de son milieu.

Les HCC sont des tumeurs très complexes du point de vue moléculaire. Contrairement à la plupart des tumeurs malignes, les HCC se développent dans un contexte d'inflammation et de lésions tissulaires. Ce contexte particulier, ainsi que les différentes causes provoquant les HCC, ne permettent pas de mettre en évidence un mécanisme moléculaire prédominant. Les études de génomique, de transcriptomique et de protéomique ont permis d'affirmer la nature très hétérogène des HCC.

Les marqueurs moléculaires font l'objet de beaucoup de recherches pour leur conférer une valeur de diagnostique et de pronostique plus efficace. Ils peuvent également représenter des cibles thérapeutiques intéressantes. Plusieurs qualités sont demandées à un marqueur : mise en évidence d'un état pathologique, valeur prédictive pour le pronostique, et cible thérapeutique. En pratique, le souhait des cliniciens serait de pouvoir identifier des groupes de patients sur des bases moléculaires et les faire correspondre à une meilleure réponse à un traitement ou à la perspective d'une évolution particulière de la maladie (récidive, métastase). La caractérisation moléculaire doit pouvoir permettre de corréliser des aberrations moléculaires avec l'agressivité de la tumeur. Ces aberrations peuvent aussi représenter de nouvelles cibles pour la chimiothérapie ou pour certaines fonctions virales utilisées en virothérapie.

La voie p53 est une voie de signalisation suppresseur de tumeur qui i) limite la survie cellulaire et la prolifération (sénescence réplivative) en réponse au raccourcissement des télomères, ii) induit l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à l'activation des oncogènes (OIS) et iii) protège l'intégrité du génome. Les mutations de la protéine p53 apparaissent dans 50% des HCC due à l'aflatoxine et dans 20-30% des HCC non due à l'aflatoxine. Le promoteur du gène p21<sup>Cip1</sup> de la voie p53 est hautement méthylé dans les HCC, comparé au stade cirrhotique (181). Le produit d'expression du gène p21<sup>Cip1</sup> est un inhibiteur des kinases cycline-dépendante CDK2 et CDK4.

La voie de signalisation p16/pRB est une autre voie de signalisation limitant la prolifération cellulaire en réponse au raccourcissement des télomères, aux dommages de l'ADN et à l'activation des oncogènes. Cette voie est activée au stade cirrhotique avec une accumulation de p16<sup>INK4a</sup> supérieure à celle observée dans le foie sain. Cette accumulation est réprimée dans les cellules précancéreuses et dans les HCC. Dans les HCC humains, la voie du rétinoblastome (p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, gènes RB1) est altérée (mutation délétion de RB1 et/ou méthylation des promoteurs de p16<sup>INK4a</sup> et p15<sup>INK4b</sup>) dans 80% des HCC (15).

L'activation de la télomérase est concomitante au passage du stade de la lésion pré-maligne vers le HCC. Plus de 90% des HCC montrent une activation de la télomérase qui est le facteur limitant pour l'immortalisation (129). Une étude chez la souris montre que le raccourcissement des télomères favorise l'initiation des tumeurs hépatiques mais que le déficit de l'activité télomérase limite la progression des stades précoces de HCC (59). L'activité de la télomérase est nécessaire pour limiter le dysfonctionnement des télomères et empêcher l'accumulation excessive d'instabilité chromosomique et de dommages de l'ADN qui pourraient handicaper la croissance de la tumeur. Les mécanismes impliqués dans la suppression de l'expression de la transcriptase inverse de la télomérase et sa réactivation dans les HCC n'ont pas été élucidés.

Ces observations suggèrent que la réactivation de la télomérase et les mutations dans les voies de contrôle de la sénescence coopèrent au cours de l'hépatocarcinogénèse. Néanmoins, ces mutations, si elles confèrent l'immortalité aux cellules, ne suffisent pas à les rendre pleinement tumorales. Cet avantage doit être

accompagné par des altérations génétiques et épigénétiques pour obtenir le phénotype cancéreux.

Les systèmes de contrôle de la prolifération et de la survie cellulaire sont constitués de nombreuses voies de signalisation qui interagissent et rendent difficile la mise en évidence des mutations originelles mais également de l'importance relative des mutations cancéreuses. Les études par comparaison de l'expression génique entre des HCC et du tissu non tumoral ont mis en évidence différents clusters de gènes. Ye et al ont comparé par microarray l'expression de 9180 gènes chez 67 patients. Ils mettent en évidence que les HCC primaires qui ne métastasent pas ont un profil d'expression remarquablement différent de celui de HCC associés à des lésions métastatiques. De plus, cette signature est associée à une différence dans la survie des patients. Ces résultats impliquent que les gènes favorisant la progression vers la métastase sont activés dans la tumeur primaire et suggèrent que ces deux types de tumeurs évoluent de manières distinctes. Les gènes surexprimés dans le profil métastatique synthétisent principalement des molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire et le contrôle de la matrice extracellulaire tel que la protéine SPP1, qui code une cytokine impliquées dans la croissance cellulaire et la dissociation, ou la métallo-protéinase de matrice MMP-9 (235). Par microarray, une autre étude montre un groupe de 12 gènes dont la répression permet de prédire une récurrence précoce intrahépatique de HCC dans 93% des cas après résection chirurgicale. Les gènes réprimés sont principalement impliqués dans la réponse immune. Le gène HLADRA code pour des fonctions de présentation des antigènes ; sa répression favoriserait l'échappement des cellules tumorales à la veille du système immunitaire. La répression du gène TRIM22, qui est normalement activé par l'interféron, suggère l'existence d'une faible réponse immune contre les cellules tumorales (85). En 2004, Lee et ses collaborateurs ont analysé l'expression génique des HCC appartenant à des groupes ayant des espérances de vie différentes (30 et 84 mois) et ont identifié un ensemble de 406 gènes dont l'expression suit une répartition identique. Les gènes de survie étant répartis de manière équivalente dans les deux catégories, les gènes de prolifération cellulaire et de maintenance représentaient 45% des gènes de survie activés pour les patients avec l'espérance de vie la plus faible et 19% pour les patients avec l'espérance de vie la plus longue. Néanmoins, les auteurs n'excluent pas que d'autres mécanismes, agissant au début du processus de cancérisation, soient responsables de cette différence (117). Un autre type de classification génétique des HCC a été proposé par Katoh et al sur la base d'altérations du profil chromosomique (gain ou perte de séquence). Le nombre d'altérations chromosomiques augmente chez les patients ayant la survie la moins longue. Les patients ayant une amplification de la région 17q11.2-25.3, codant pour une protéine terminale de la voie de signalisation mTOR, sont des candidats idéals pour recevoir une thérapie basée sur l'utilisation d'inhibiteurs mTOR (101). Une autre amplification fréquente concerne la région codant pour le VEGF (vascular endothelial growth factor), qui regroupe une catégorie importante de patients. Ces patients ont montré une augmentation de leur espérance de vie après avoir reçu du sorafenib, un inhibiteur tyrosine kinase agissant sur le récepteur au VEGF (130). L'instabilité chromosomique amplifie à elle seule le nombre de voies de signalisation activées au cours de cette cancérogénèse. Comme dans beaucoup de cancers, elle favorise l'acquisition de résistances aux drogues thérapeutiques. L'instabilité chromosomique et les mutations affectant la prolifération sont les deux principaux critères génétiques permettant de regrouper des patients appartenant à des études distinctes mais avec un profil clinique semblable.

Le réseau d'interaction engendré par l'expression génique spécifique des HCC est également utilisable pour classer les HCC. Les voies de signalisation cellulaires spécifiquement modifiées, activées ou réprimées au cours du processus tumoral signe un type de HCC et éventuellement un état clinique mais, de par leur réactivité, elles sont également très intéressantes en tant que cibles thérapeutiques.

La séquence des voies de signalisation oncogéniques activées au cours de l'hépatocarcinogénèse est en grande partie inconnue. Les voies de signalisation oncogènes activées apparaissent être plus hétérogènes dans les HCC que dans les autres types de tumeur. Dans le reste de ce chapitre seront expliquées les voies de signalisation dans les HCC humains établis. Même si ces voies ont montré qu'elles pouvaient induire un stress oncogénique in vitro, aucune donnée in vivo n'a permis de déterminer leur pouvoir de transformation cellulaire.

Le proto-oncogène c-myc est fréquemment surexprimé dans les lignées cellulaires d'hépatomes. Ce gène est impliqué dans la différenciation et la croissance cellulaire. Sa répression induit la différenciation et l'inhibition de la croissance des cellules. Des études in vivo montrent que l'expression de c-myc augmenterait graduellement depuis le foie sain jusque l'hépatite chronique, la cirrhose et le HCC (81). C-myc est surexprimé dans plus de 50% des HCC ainsi que dans le tissu sain périphérique suggérant une implication précoce de ce gène. Des études récentes ont montré que l'activation de c-myc est étroitement associée avec la conversion des cellules des noyaux préneoplasiques en HCC (95). L'ARNm de c-myc est présent en plus grande quantité dans le tissu péri-tumoral que dans les HCC renforçant l'hypothèse de son implication dans la transformation (239). Néanmoins, des résultats suggèrent que des modifications post transcriptionnelles permettraient à la protéine c-myc d'être stabilisée et de jouer un rôle dans la maintenance du phénotype tumoral (226). Le facteur HIF (hypoxia inducible factor) notamment pourrait augmenter l'activité c-myc en stabilisant la protéine (47). Aucune mutation affectant sa fonction pro-apoptotique n'a été trouvée dans les HCC. Finalement, de multiples voies de signalisation tel que RAS/RAF/MAPK, JAK/STAT et Wnt/ $\beta$ -catenin, pourraient réguler l'activité transcriptionnelle de c-myc. Ainsi, il semble que la voie de signalisation c-myc joue un rôle central dans la régulation de l'hépatocarcinogénèse.

La fréquente inactivation de p53 dans les HCC humains indique que la perte de l'apoptose dépendante de p53 peut promouvoir l'hépatocarcinogénèse. Par ailleurs, des voies de signalisation indépendantes de p53 peuvent également induire l'apoptose en réponse aux disfonctionnements des télomères (114). La protéine Hint2, qui agit au niveau de la mitochondrie en sensibilisant la cellule à l'apoptose, est réprimée dans les HCC humains. Cette mutation correspond à un mauvais pronostic (136). L'activation de la voie de signalisation Akt est impliquée dans la résistance à l'apoptose dans 40 à 60% des HCC, souvent associée à l'inhibition de la PTEN (phosphatase and tensin homolog), un régulateur négatif d'Akt. L'activation de la voie Akt supprime l'apoptose induite par TGF- $\beta$  et l'activité antiproliférative de la « CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  ». Ces deux effets favorisent la cancérisation des cellules ayant échappé à la sénescence au stade cirrhotique. L'activation de la voie Akt a été reliée à l'activation de la voie  $\beta$ -catenin (83)

On recense également l'activation des voies EGF (epidermal growth factor), IGF, HGF, MAPK (RAS/mitogen-activated protein kinase), Akt/mTOR, NF- $\kappa$ B, TGF- $\beta$  et Wnt- $\beta$  catenin (220). Certaines voies de signalisation sont utilisées pour définir des classes de patients, tel que la  $\beta$ -catenin et hedgehog (impliquées dans la différenciation) et IGF,

Ras/MAPK et mTOR impliquées dans la prolifération cellulaire. De nombreuses voies de signalisation oncogéniques sont donc activées dans les HCC.

Les études de génomique associées à des études de protéomique mettent aussi en évidence des mutations dans les voies de signalisation des cellules cancéreuses. Une étude de Boyault et collaborateurs (23), donne une description à plusieurs paramètres des HCC et identifient deux groupes de patients. Le premier groupe est caractérisé par une perte fréquente d'allèle, des mutations dans Axin1 et p53, l'activation de la voie Akt et une surexpression d'insulin-like growth factor (IGF)-2. Le deuxième groupe comporte des patients avec un faible taux de perte allélique, des mutations fréquentes de  $\beta$ -catenin et une localisation nucléaire de cette dernière suite à l'activation de la voie Wnt (233). Ces catégories ne sont pas corrélées à une différence de survie des patients.

L'analyse des traitements chimiques permet également de montrer les voies de signalisation pathologiquement effectives dans les HCC. Plusieurs drogues ont été développées pour bloquer les voies de signalisation citées plus haut, à différents niveaux. Beaucoup de ces drogues bloquent la voie de signalisation EGF (erlotinib) ou l'angiogénèse (bevacizumab). L'activation de PI3K active la kinase Akt qui phosphoryle et inactive plusieurs protéines proapoptotiques. Cette voie est activée dans 50% des HCC (219). Cette activité peut également conduire à la prolifération cellulaire. De plus, mTOR est une protéine en aval d'Akt qui régule la traduction des ARNm cellulaires grâce à la protéine 1 liant le facteur eucaryote d'initiation de la traduction (4E-BP1) et à la kinase p70s6k. La rapamycine est un antibiotique qui inhibe mTOR et affecte ainsi la traduction des ARNm codant pour des protéines régulant la prolifération cellulaire ou l'angiogénèse tel que c-myc, la cycline D1 ou HIF-1 $\alpha$  (206). La voie HIF est également très active dans les HCC comme nous le verrons plus loin dans ce chapitre. Il n'existe pas de drogues agissant sur la voie Wnt, active dans 30% des HCC (23). Récemment, la découverte de la molécule sorafenib a permis d'améliorer significativement la survie de patients avec un stade avancé de HCC. Le sorafenib est un inhibiteur de plusieurs protéine-kinases. Il cible deux voies importantes impliquées dans l'hépatocarcinogénèse : l'angiogénèse, en inhibant les tyrosine kinase VEGFR2 et PDGFR, et la prolifération cellulaire, en inhibant la sérine thréonine kinase b-RAF (Ras/MAPK). Les responsables de l'essai clinique utilisant cette drogue soulignent l'importance de cibler plusieurs voies de signalisation pour augmenter l'effet bénéfique d'une thérapie. La même démarche peut être appliquée à la thérapie génique en utilisant des gènes dont les produits d'expression peuvent interférer avec plusieurs voies de signalisation activement présentes dans les tumeurs établies. Le sorafenib peut désormais être utilisé à des stades moins avancés de la maladie où le meilleur état général du patient est susceptible de potentialiser les effets bénéfiques du traitement.

Enfin, il faut mentionner que de nombreux miRNA (micro ARN) sont exprimés de façon aberrante dans les HCC. Les miRNA interviennent dans un grand nombre de fonctions physiologiques tel que le développement, la différenciation cellulaire, l'inflammation ou la réponse immunitaire. La découverte d'un lien entre l'altération de l'expression de certains miRNA et la tumorigénèse a permis de leur supposer un rôle oncosuppresseur (28). Les miRNA peuvent être soumis aux mêmes altérations que des oncogènes ou des suppresseurs de tumeur classiques (amplifications, translocation, délétions, mutations) mais leur expression est le plus souvent réprimée dans les tissus tumoraux (131). L'analyse de l'expression d'un grand nombre de miRNA dans des tumeurs humaines a permis d'identifier des profils d'expression spécifiques des tissus tumoraux et non tumoraux de même origine. Dans les HCC, on observe une expression faible de

nombreux miRNA dont miR-122 (67). Ce miRNA, essentiel au fonctionnement hépatique, représente à lui seul 70 % de l'expression des miRNA du foie. Une sous-expression de miR-122 à la fois dans les HCC et les tumeurs bénignes suggère que la dérégulation de miR-122 serait liée à des événements précoces de tumorigenèse (111). Certains miRNA sont sur-exprimés dans les HCC, tels que miR-21, miR-221 et miR-222. Ces surexpressions sont également communes à d'autres types de cancer (90, 141). Le profil d'expression spécifique des miRNA a permis de renforcer les signatures des profils d'expression génique ou des profils phénotypiques tumoraux pour classer les patients et orienter les traitements des HCC. En thérapie, les miRNA sur-exprimés peuvent être ciblés par des nucléotides anti-miRNA. La transfection de gliomes et de cellules de cancer du sein avec un anti miR-21 supprime la croissance cellulaire en association avec une augmentation de l'apoptose (194).

### **E. L'environnement tumoral et le système immunitaire**

Si les mutations génétiques et les modifications épigénétiques sont caractéristiques d'une cellule cancéreuse, la véritable identité d'une tumeur se mesure aussi en étudiant son phénotype cellulaire, son environnement tissulaire et les réactions de l'organisme atteint. Du point de vue histologique, la tumeur grossit en prenant l'avantage sur son environnement (faible taux d'O<sub>2</sub>, nutriments rares et barrières naturelles à la croissance représentées par les tissus normaux périphériques). Certaines qualités du microenvironnement de la tumeur sont nécessaires à son développement.

L'HCC se développe fréquemment dans un contexte d'inflammation chronique du foie. La cirrhose se caractérise par une activation des cellules stellaires. Il en résulte une augmentation de la production de protéines de la matrice extracellulaire, de cytokines, de facteurs de croissance et de produits du stress oxydatif (16). Des résultats récents montrent que l'inflammation a un rôle important dans l'initiation, la croissance et la progression des tumeurs et que la voie NF- $\kappa$ B occupe une place centrale dans ce phénomène (156). La voie NF- $\kappa$ B peut être activée par l'action concertée des cytokines ou interleukines tel que TNF- $\alpha$  ou IL6, des chémokines et de certaines protéines virales, probablement impliquées dans la survie des cellules précancéreuses (8). Le rôle de NF- $\kappa$ B a été étudié en inhibant son activité dans différents modèles murins d'HCC. Les souris Mdr2-knockout ont un défaut de sécrétion des phospholipides dans la bile, ce qui induit une inflammation chronique du foie. La majorité de ces souris développe un HCC à l'âge d'un an. Les auteurs observent que NF- $\kappa$ B, activé par l'inflammation, n'a pas d'incidence sur les premières étapes de la cancérisation mais en revanche, favorise la progression de la tumeur dans des étapes plus tardives (137). Les souris nourries avec du diethylnitrosamine (DEN) développent également un HCC dans le contexte d'une lésion tissulaire aiguë sans développer d'inflammation chronique. L'hépatocarcinogénèse est, dans ce cas, corrélée avec l'augmentation des radicaux libres d'oxygène et la mort cellulaire qui induit une hyper prolifération compensatoire propice à l'apparition des hépatomes. Contrairement au modèle précédant, l'inhibition de NF- $\kappa$ B, en supprimant son rôle antiapoptotique, augmente la mort cellulaire et l'hyper prolifération, favorisant ainsi l'apparition des tumeurs (132).

Budhu et collaborateurs (23) ont comparé les profils d'expression génique dans le tissu hépatique péri-tumoral de patients avec ou sans métastases. Ils montrent un ensemble de 17 gènes qui distinguent significativement ces deux états cliniques et

prédisent également l'évolution de la maladie. Ces gènes sont pour l'essentiel impliqués dans la réponse immune et inflammatoire. Par ailleurs, les mêmes auteurs ont identifié une vingtaine de miRNA associés aux métastases (25).

La masse tumorale est infiltrée par les cellules des systèmes immunitaires inné et adaptatif qui éliminent les cellules cancéreuses sénescents tout comme au sein d'un tissu sain. De plus, des travaux récents montrent que le système immunitaire tolérerait les cellules tumorales comme toutes les cellules du soi et inhiberait la réaction immune anticancéreuse qui survient lors de l'apparition des premiers antigènes cancéreux (48). Ce phénomène particulier de tolérance des cellules cancéreuses semble régulé par les cellules Treg et sera débattu plus loin dans ce chapitre.

Le système immunitaire inné est constitué des lymphocytes natural killer (NK), des macrophages et des cellules dendritiques (DC). Il répond de manière rapide et non-spécifique à différentes situations d'infection ou d'inflammation. Ces cellules, appelées APC (antigen presenting cells), présentent les peptides issus de la phagocytose aux cellules du système immunitaire spécifique. Le système immunitaire inné participe aux processus cancéreux des HCC. Le contexte inflammatoire, les acides nucléiques dans un contexte d'infection virale ainsi que les produits des hépatocytes en nécrose, peuvent activer les TLR et induire, en réponse, la production d'interleukine-6. La délétion du suppresseur de cytokine SOCS3 (suppressor of cytokine signalling-3), un régulateur négatif de l'IL-6, favorise l'hépatocarcinogénèse induite par hépatite dans un modèle murin (160).

Un antigène est une molécule qui, au sein d'un organisme, n'est pas reconnue comme appartenant au Soi par le système immunitaire. Les cellules cancéreuses font partie des cellules somatiques et le produit d'expression de leurs gènes, présenté à leur surface ou par les cellules présentatrices d'antigènes après phagocytose, est susceptible d'être toléré par le système immunitaire. Ce paradigme sert de toile de fond au débat sur l'existence d'une réponse immune anticancéreuse. Les antigènes tumoraux sont mis en évidence suite à l'identification d'une sous population de lymphocytes T spécifiques possédant des récepteurs pour identifier les antigènes associés au CMH I ou II. De nombreuses molécules identifiées dans les HCC avec une expression différentielle par rapport aux tissus sains, sont susceptibles de déclencher une réponse immune spécifique dirigée contre les cellules tumorales. La protéine AFP, par exemple, est une protéine fœtale, qui est fréquemment exprimée dans les HCC mais également de façon transitoire pendant la régénération du tissu hépatique. AFP peut être présentée aux LT CD4+ et CD8+. Plusieurs études sur l'homme et la souris ont rapporté la présence d'une réponse immune spécifique d'AFP (27, 72). Des LT dirigées contre des peptides de la protéine AFP sont retrouvés dans le sang périphérique de patients atteints d'HCC mais font également partie du répertoire de patients infectés par HCV ou d'individus contrôles sains. AFP étant un antigène du Soi, l'immunité anti-tumorale pourrait impliquer une réaction auto-immune. Plusieurs antigènes tumoraux sont ainsi des antigènes du Soi mais ont démontré leur immunogénicité dans des cas de mélanome et d'HCC, tels que les antigènes MAGE, NY-ESO, glypcan-3, aurora-A, hTERT (31, 144).

Les cellules NKT sont une population de lymphocytes T fortement présente dans le foie et qui jouent un rôle dans l'adaptation de la réponse immune spécifique (205). Dans les cancers, les NKT ont un rôle ambivalent puisque certaines sous-populations ont un rôle protecteur (NKT de type I) et d'autres inhibent l'immunité tumorale (NKT de

type II). Seules des études sur modèles murins ont montré que les NKT de type I participent à la suppression des HCC (191).

Les lymphocytes T cytotoxiques CD8<sup>+</sup> sont considérées comme la plus importante population de cellules immunes anticancéreuses. Il a été montré que de petites tumeurs de HCC infiltrées par des cellules T majoritairement CD8<sup>+</sup>, étaient associées à un plus faible taux de récurrence et un taux de survie supérieur à 5 ans, par rapport aux tumeurs sans infiltration de cellules T (221). Les cellules CD8<sup>+</sup> spécifiques de différents épitopes d'AFP ne semblent pas enrichies dans la masse tumorale par rapport à leur concentration sanguine (205). Une explication possible du manque de CD8<sup>+</sup> spécifiques d'AFP est une trop faible présentation de cet antigène.

Les lymphocytes T helper CD4<sup>+</sup> (Th) participent à la réponse immune contre les microorganismes, mais peuvent également avoir un rôle immunosuppresseur ou des activités cytotoxiques. Les Th sont divisées en 3 sous populations qui diffèrent selon les fonctions des cytokines secrétées : Th1 joue un rôle important dans la réponse immune cellulaire et les pathogènes intracellulaires, Th2 stimule la production d'anticorps par les cellules B, et Th17 joue un rôle dans l'inflammation tissulaire et l'activation des neutrophiles pour combattre les bactéries extracellulaires. Les cellules Th1 ont montré une activité anti-tumorale dans plusieurs cancers. Une étude récente montre qu'un ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> élevé est associé à un risque réduit de récurrence après transplantation hépatique, possède une valeur prédictive supérieure au critère de Milan, et équivaut au paramètre d'évaluation de l'invasion vasculaire pour prédire la réapparition de foyers tumoraux (214). Certaines cytokines secrétées par les Th jouent des rôles opposés dans le processus de métastase (26). Les cytokines Th1 et Th2 fonctionnent comme des facteurs pro et anti-inflammatoires respectivement. Les cytokines Th2, comme IL-4, 5, 8 et 10, peuvent réguler négativement les cytokines Th1, comme l'IFN- $\gamma$  ou le TNF- $\alpha$ , et vice versa. Dans le processus pro inflammatoire, les cytokines Th1 activent les cellules immunes telles que les macrophages et les cellules NK, qui produisent une réponse pro inflammatoire anti-métastatique. A l'inverse, dans certaines conditions, telles que la présence d'une tumeur ou d'une prédisposition génétique, les populations de cellules immunes peuvent devenir alternativement activées et sécréter des cytokines anti-inflammatoires. Ce déplacement du profil de sécrétion de cytokines Th1 vers un profil Th2 est associé à un profil métastatique des HCC. Ce déplacement de la réponse cytokine s'accompagne d'une activation des macrophages qui pourraient également jouer un rôle pro-métastatique (24).

La progression des HCC malgré l'existence de cette réponse antitumorale suggère l'existence de mécanismes répresseurs de l'immunité spécifique anticancéreuse. Ces mécanismes incluent, notamment, la production de cytokines immunosuppressives tel que le TGF- $\beta$  ou les prostaglandines, l'augmentation des cellules T régulatrices et la génération des macrophages inhibiteurs ou des MDSC (myeloid derived suppressor cells) (42).

Les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> régulatrices caractérisées par l'expression du facteur de transcription Foxp3, appelées Lymphocytes régulateurs, ou Tregs) jouent un rôle central dans l'homéostasie immunitaire. Elles inhibent l'activation, la prolifération et les fonctions des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> et NK et contribuent ainsi à la tolérance immunitaire des cellules cancéreuses (229). Les Tregs peuvent inhiber, in vitro, la réponse immune des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> et des CD8<sup>+</sup> par contact et de manière indépendante des cytokines (184). In vivo, les mécanismes semblent être plus complexes et notamment dépendants de la présence de COX-2 (64). Plusieurs études

montrent que le microenvironnement tumoral aussi bien que le sang périphérique ou même l'ascite des patients HCC sont enrichis en Treg (63, 215). Ces cellules isolées sont capables de supprimer la prolifération des cellules CD4+CD25- et leur synthèse de cytokines. L'augmentation des Treg a été associée à la présence de l'invasion vasculaire (215), l'absence d'encapsulation de la tumeur et la progression des stades tumoraux (63). Les patients avec une grande prévalence de Tregs au sein du HCC montrent un taux de survie significativement plus faible (107). De plus, au cours de la progression de l'hépatocarcinogénèse, la prévalence des Tregs augmente de façon corrélée à la diminution du nombre de CD8+ (107). La balance entre les cellules Treg et CD8+ est probablement très importante pour la progression des HCC. Sur un modèle animal, la déplétion des Treg provoque le rejet de la tumeur par les cellules cytotoxiques CD8+ (92). Des études cliniques montrent que la faible présence de Tregs dans la tumeur associée à un fort taux de CD8+ intratumoral est un facteur indépendant de pronostic positif pour la survie (218). Récemment, un essai clinique de phase I a montré que l'utilisation de cyclophosphamide chez les patients HCC diminuait de manière significative la prévalence des Tregs (71).

L'efficacité anticancéreuse des LT CD8+ est évaluée *in vitro* par des tests de cytotoxicité. *In vivo*, la présence de cellules Treg résulte en une réponse immune anticancéreuse moins visible. Les HCC sont reconnus comme étant des tumeurs faiblement immunogènes. Néanmoins, l'existence des cellules antitumorales CD8+ effectives rend évident l'intérêt de stimuler le système immunitaire contre les cancers. Dans le cas des HCC, certaines thérapies d'ablation locale, de par leur action cytolytique, sont supposées augmenter la libération et la présentation des antigènes tumoraux, les cellules tumorales en nécrose étant probablement phagocytées par les cellules APC. De plus, la réaction anti-inflammatoire non-spécifique engendrée par l'ablation des tumeurs par radio fréquence (RFA) pourrait aider à combattre la tolérance immunitaire et l'anergie rencontrées dans les tumeurs solides (234). Peu de données sont disponibles sur la réaction immune post opératoire des HCC. Une étude montre clairement que le nombre de CD4+ Th et de CD8+ cytotoxiques circulants, ainsi que l'activité des cellules T cytotoxiques, est multiplié respectivement par 5, 6 et 100 fois, quatre semaines après une RFA. Dans cette étude, 2 patients avec une récurrence locale de la tumeur montraient une faible activité cytotoxique contre les cellules cancéreuses (77). Différents moyens sont utilisés pour accroître l'immunogénicité des HCC afin d'augmenter l'infiltration de cellules effectrices antitumorales. Ainsi, un essai clinique a consisté à injecter des cellules dendritiques et un broyat de cellules tumorales autologues à 31 patients HCC. Suivant le protocole associant injection de DC et rappel d'immunisation, l'espérance de survie augmentait de 1 à 2 ans par rapport aux patients contrôles (118). Parmi les essais cliniques ayant conduit à l'amélioration du malade, on peut citer l'injection d'IL-12, employée pour augmenter l'infiltration tumorale, et la vaccination en injectant des antigènes tumoraux combinés au GM-CSF. Les protocoles d'immunothérapie proposent la mise en place de la vaccination pendant la phase cirrhotique pré cancéreuse pour empêcher la tolérance immunitaire et réservent l'immunothérapie cytotoxique pour le traitement du cancer établi.

L'implication du système immunitaire dans le processus tumoral est désormais bien admis, même si la nature de cette participation reste un sujet controversé et complexe. Les expériences mettant en œuvre l'infection des tumeurs par des virus oncolytiques permettent également d'étudier la réponse immune anticancéreuse. Ce thème sera exposé dans la partie III, consacrée aux virus HSV-1 oncolytiques.

### 3. La virothérapie oncolytique

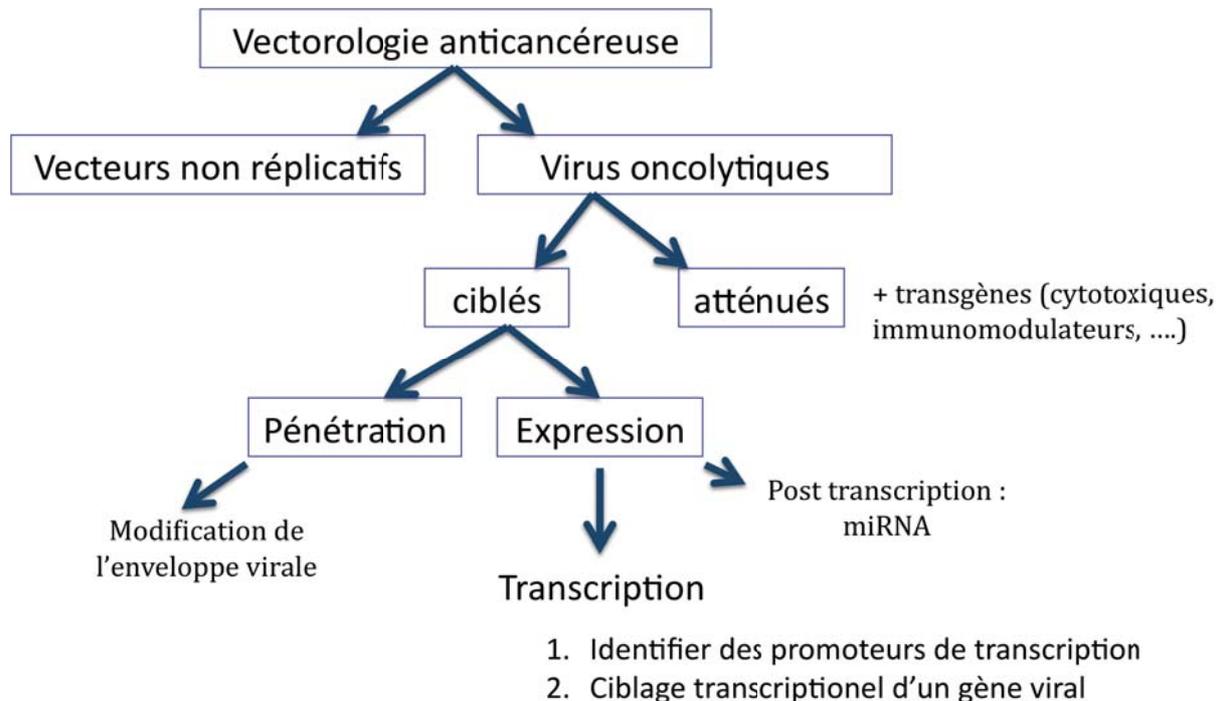
#### A. Historique

L'idée de détruire des cancers en utilisant des virus lytiques est apparue au début du vingtième siècle. A cette époque, on observa une rémission de certaines tumeurs suite à une infection naturelle. Dans les années 1920, eurent lieu les premières expériences sur animaux pour valider cette hypothèse. Les premiers essais thérapeutiques chez l'homme commencèrent dans les années 1940 et utilisaient des poxvirus atténués. Ces premiers essais ne furent pas concluants et un consensus a peu à peu émergé pour affirmer que les virus atténués, bien que relativement sûrs pour l'organisme, sont trop peu virulents pour détruire une masse cancéreuse. Cette stratégie fut reprise plus tard, au début du XXI<sup>ème</sup> siècle, en utilisant des virus à ADN ou ARN, génétiquement manipulés en laboratoire. Ces virus s'avèrent surs, mais semblent encore trop peu agressifs vis-à-vis des tumeurs. Ce consensus motive aujourd'hui deux axes majeurs de recherche en virothérapie oncolytique : l'armement de virus atténués avec des transgènes cytotoxiques, et le ciblage de virus agressifs par le contrôle de la pénétration ou de l'expression génique (voir figure V).

Plusieurs types de réponses cellulaires à l'infection virale ont été décrits, dont l'apoptose, la réponse antivirale innée, la réponse inflammatoire et la réponse au stress. Les cellules cancéreuses, par ailleurs, surexpriment ou au contraire sous-expriment un ensemble de fonctions de manière spécifique. Ces processus moléculaires existent au cours de l'infection oncolytique et de manière dépendante du type tumoral ou de l'avancée de la pathologie. Le système immunitaire contrôle également la prolifération du virus et la progression de l'infection. La virothérapie oncolytique a pour but de tirer profit de la présence ou de l'absence d'une ou plusieurs de ces fonctions cellulaires afin que le virus ne se multiplie que dans les cellules tumorales. Cliniquement, on souhaite que la réplication soit optimale dans les cellules tumorales et qu'il n'y ait pas de multiplication du virus dans le reste de l'organisme (figure VI.A). Les lésions des tissus sains, si elles sont inévitables, doivent être contrôlables et ne pas nuire au pronostic vital et à la rémission du cancer.

Un avantage important des virus oncolytiques répliatifs, par rapport aux virus cytotoxiques défectifs, est leur capacité à simultanément détruire les cellules infectées de par leur pouvoir lytique, et à produire des particules virales qui détruiront les cellules cancéreuses adjacentes jusqu'à atteindre en principe l'ensemble de la masse tumorale (figure VI.B). Il y a deux manières de modifier un virus naturellement lytique pour en faire un virus spécifiquement oncolytique (figure V). La première et plus ancienne stratégie consiste à supprimer des fonctions virales essentielles qui sont complémentées, ou qui sont inutiles, dans les cellules tumorales mais ne le sont pas dans les cellules saines. Ainsi, le virus pourra se répliquer et se disséminer seulement dans les cellules tumorales. Cette stratégie a fait naître des virus HSV-1 atténués qui ont principalement pour base un génome privé du gène codant la protéine multifonctionnelle ICP34.5. La deuxième stratégie consiste à cibler la pénétration du virus ou l'expression de fonctions virales dans le tissu cancéreux. Ces fonctions n'étant pas exprimées dans le tissu sain, le virus ne pourra s'y multiplier. Ce ciblage peut être réalisé soit en modifiant la surface du virus de manière à ce que le virus ne puisse pénétrer que dans les cellules cancéreuses, soit en plaçant l'expression d'une fonction

virale sous contrôle des promoteurs cellulaires actifs spécifiquement dans les cellules cancéreuses, de manière à ce que le virus ne se multiplie que dans ces cellules. Cette dernière approche est le cadre de mon travail de thèse.

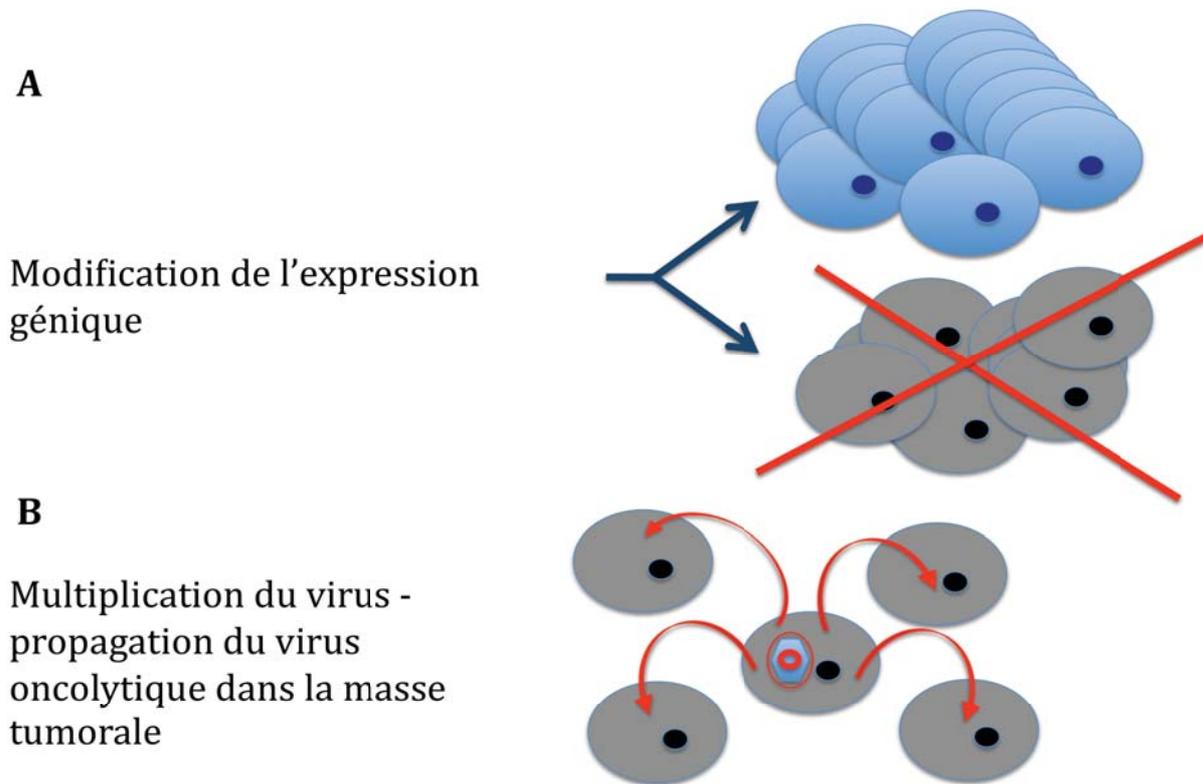


**Figure V : Les différentes stratégies de la vectorologie anticancéreuse.** A la différence des vecteurs non répliatifs qui n'agissent que dans les cellules infectées, les vecteurs répliatifs ou « virus oncolytiques » se multiplient et se propagent dans les tissus. Il existe deux grandes familles de virus oncolytiques ou deux stratégies pour restreindre leur pouvoir de réplication aux seules cellules cancéreuses. Les virus atténués sont délévés de fonctions virales qui sont complétées ou inutiles dans les cellules cancéreuses ou non complétées ou inutiles dans les cellules saines, garantissant ainsi l'achèvement du cycle viral dans les cellules cancéreuses uniquement. Les virus ciblés possèdent l'ensemble des gènes du virus sauvage mais sont ciblés soit au niveau de l'entrée du virus en modifiant les glycoprotéines de surface virales afin qu'elles reconnaissent des marqueurs de surface tumoraux soit au niveau de leur expression en leur ajoutant des séquences miRNA spécifiques ou en utilisant des promoteurs de transcription spécifiques des cellules à cibler à la place des promoteurs viraux endogènes. La méthodologie utilisée au cours de ma thèse consiste à identifier et valider des promoteurs cellulaires spécifiques des cellules ciblées puis à placer ces promoteurs dans le génome viral devant des gènes viraux essentiels.

## B. Virus HSV-1 oncolytiques atténués

La réponse antivirale à l'infection HSV-1 comporte plusieurs mécanismes de défense cellulaire dont l'inhibition de la machinerie de traduction. Suite à l'infection virale, les ARN double brins viraux qui sont synthétisés à partir des deux chaînes de l'ADN, sont

reconnus par la PKR qui devient active. Cette kinase phosphoryle alors le facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$  provoquant l'arrêt général de la traduction et le blocage de l'infection. Le virus HSV-1 code pour deux protéines qui évitent la phosphorylation de eIF2 $\alpha$  : la protéine ICP34.5, codée par le gène  $\gamma_1$  34.5, impliquée



**Figure VI : Les principes majeurs de la virothérapie oncolytique.** **A** Les virus sont génétiquement modifiés afin qu'ils ne se répliquent pas dans les cellules saines mais se répliquent seulement dans les cellules cancéreuses, provoquant par conséquent leur destruction. **B** Les virus oncolytiques sont des virus répliatifs. Un petit nombre de cellules cancéreuses est infecté dans lequel le virus oncolytique se multiplie. Les virions produits vont ensuite infecter les cellules cancéreuses adjacentes. Les cycles de réplication se poursuivent jusqu'à l'infection-destruction de toutes les cellules de la masse cancéreuse.

également dans la neurovirulence, et la protéine Us11, codée par un gène de type  $\gamma_2$ , qui fait partie de la structure de la particule virale. De par leur cinétique d'expression, ces protéines empêchent l'inactivation de eIF2 $\alpha$  à deux moments différents du cycle de réplication. Ainsi, la protéine ICP34.5 provoque la déphosphorylation du facteur eIF2 $\alpha$ , alors que la protéine Us11, qui se lie à l'ARN double brin, bloque l'activation de la PKR. Les virus HSV-1 délétés du gène ICP34.5 (HSV-1 $\Delta$ 34.5) subissent une diminution de la synthèse protéique qui provoque un arrêt de la réplication dans la plupart des types cellulaires, y compris dans un grand nombre de cellules cancéreuses. Cependant, dans les cellules tumorales avec une réponse antivirale dérégulée, ces virus parviennent à se multiplier. De plus, les virus HSV-1 $\Delta$ 34.5 sont également hypersensibles à l'interféron  $\alpha$

et subissent donc aussi cet aspect de la réponse innée antivirale (168). Ils retrouvent en partie leur neurovirulence dans des souris déficientes pour l'immunité innée (119). D'autres processus cellulaires participent également à l'inhibition de l'infection. Pour contrôler les différents aspects de ces réponses, le virus HSV-1 a développé plusieurs fonctions. Ainsi, quelques virus atténués ont été construits sur le modèle du virus HSV-1 $\Delta$ 34.5 mais pour faire face à d'autres types de réponses montrant des variations entre cellules saines et cancéreuses. On retiendra en particulier les virus HSV-1 privés des gènes ICP0 ou Us3, qui bloquent des réponses cellulaires antivirales ou anti-apoptotiques (126).

L'inactivation par mutation du gène  $\gamma$  34.5 a permis de construire la base de la plupart des HSV-1 oncolytiques atténués utilisés aujourd'hui en essais cliniques et précliniques. Les premiers HSV-1 $\Delta$ 34.5 furent testés dans les années 90 et montrèrent une activité oncolytique sur des modèles murins de gliome humain (35, 79) de cancer du poumon (non Small cell lung cancer) (4, 211) et de cancer de l'ovaire (44), puis ils furent testés sur un plus large panel de types de cancers. Ces premières souches HSV-1 $\Delta$ 34.5 avaient en commun le fait d'augmenter l'espérance de vie des modèles animaux. Ces virus atténués, bien que ne présentant pas de signes d'encéphalite et montrant une innocuité totale vis à vis du système nerveux (104), se sont avérés néanmoins trop handicapés face à l'inhibition de la synthèse protéique pour se multiplier efficacement et détruire toutes les cellules cancéreuses (145).

Divers auteurs essayèrent d'augmenter l'efficacité oncolytique des virus HSV-1 $\Delta$ 34.5 de diverses façons. Ainsi, ces virus furent injectés en association avec de la chimiothérapie (3, 211), de la radiothérapie (4, 21, 102, 142), des inhibiteurs de la PKR (108), ou furent modifiés pour exprimer l'IL-12 afin de stimuler l'infiltration de macrophages ou de cellules CD4+ et CD8+ dans la masse tumorale (79, 167) ou le GM-CSF pour activer la différenciation des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes tumoraux (124). Le gène codant ICP34.5 étant présent en 2 exemplaires dans le génome viral, une des tentatives pour augmenter la toxicité des virus HSV-1 $\Delta$ 34.5 consista à ne supprimer qu'un seul des deux gènes. Ce virus, également amélioré par une mutation de la glycoprotéine B favorisant la formation de syncytia, montre une activité oncolytique plus efficace sur un modèle murin de xénogreffe de cancer du sein (87). Ce virus malheureusement, retrouve aussi en partie sa neurovirulence et est de ce fait pénalisé pour poursuivre vers un essai clinique (87). D'autre part, des virus HSV-1 $\Delta$ 34.5 furent armés avec des gènes thérapeutiques, tel que le CYP2B1, un activateur des précurseurs de drogues anticancéreuses comme le cyclophosphamide et l'irinotecan (212).

Pour augmenter la spécificité du ciblage tumoral, les souches HSV-1 $\Delta$ 34.5 ont été privées d'un second gène, UL39, codant la protéine ICP6, qui est une sous-unité de la désoxyribonucléotide réductase (RR). Cette enzyme virale permet aux virus de disposer d'une quantité suffisante de désoxyribonucléotides pour la synthèse de leur ADN. Ces nucléotides se trouvent en quantité suffisante dans les cellules qui se multiplient activement, telles que les cellules cancéreuses où le virus peut se passer de la RR, mais sont, par contre, en quantité insuffisante dans les cellules quiescentes. Dès lors, les virus ne synthétisant pas la RR se multiplient mieux dans les cellules tumorales en division par rapport aux cellules saines quiescentes. Cette stratégie a été utilisée pour améliorer la multiplication d'un virus doublement muté (HSV-1 $\Delta$ 34.5/ $\Delta$ ICP6), appelé G207, qui a montré un effet oncolytique sur un modèle de cancer de la prostate (169) et est actuellement en phase clinique I-II pour le traitement du gliome (5). Un virus HSV-1 $\Delta$ ICP6 montre de son côté un effet oncolytique sur un modèle murin de xénogreffe de cancer de l'ovaire. Néanmoins, les cellules tumorales qui ne se multiplient pas sont peu

permissives à l'infection par ce virus, diminuant l'intérêt de cet approche (157, 198). La radiothérapie, en augmentant l'activité de la RR cellulaire pourrait améliorer la capacité répliquative de ce virus (199). On peut noter ici que la radiothérapie augmente l'expression des gènes tardifs d'HSV-1 via l'activation de la voie de signalisation p38. Ce mécanisme permet d'augmenter l'expression des gènes tardifs du virus HSV-1 $\Delta$ 34.5 pour lesquels la synthèse protéique est diminuée par rapport au virus sauvage (142). Dans le même registre, l'activation de la protéine GADD34, un homologue cellulaire d'ICP34.5, par le cisplatine a montré un effet positif sur la capacité d'un virus HSV-1 $\Delta$ 34.5 à détruire des lignées de cellules de mésothéliome malin de la plèvre (3).

Enfin, un virus de type HSV-1 $\Delta$ 34.5 a été l'objet d'une deuxième mutation, le privant du gène codant la protéine ICP47. Cette protéine agit en bloquant la présentation des antigènes par le CMH à la surface de la cellule infectée. Cette mutation confère donc une plus grande immunogénicité à l'infection oncolytique. Ce même virus, mais exprimant en plus le GM-CSF, a montré un effet oncolytique et le développement d'une réponse immune anticancéreuse contre plusieurs modèles de cancer sur souris immunocompétentes (124) et est actuellement en phase II pour le traitement du mélanome métastatique (190). Ce double mutant, HSV-1 $\Delta$ 34.5/ $\Delta$ ICP47, a également montré une capacité de multiplication restaurée par rapport au virus HSV-1 $\Delta$ 34.5, qui s'explique par un changement de cinétique de l'expression du gène Us11. En effet, la suppression de l'ORF du gène Us12, codant pour ICP47, a placé le gène Us11 sous le contrôle du promoteur précoce d'Us12 (204). Ainsi, l'expression d'Us11 devenant très précoce, elle empêche le blocage de la traduction provoquée par l'absence de la protéine ICP34.5, en inhibant l'activation de la PKR avant qu'elle ne phosphoryle le facteur eIF2 $\alpha$ . Ce virus, bien que possédant une capacité de réplication restaurée, conserve l'atténuation de la neurovirulence propre aux HSV-1 $\Delta$ 34.5 (146). Ces virus retrouvent également une résistance à l'interféron. Ce nouveau virus, HSV-1 $\Delta$ 34.5/ $\Delta$ ICP47, est actuellement le virus HSV-1 oncolytique atténué qui semble le plus prometteur. Il montre qu'il est possible d'augmenter les capacités de réplication d'un virus HSV-1 $\Delta$ 34.5 à l'aide d'une seconde mutation, ainsi que l'intérêt d'utiliser les fonctions virales avec une cinétique différente de celle du virus sauvage (61).

La caractérisation des tumeurs permet d'expliquer en partie l'effet cytopathogène propre aux virus HSV-1 $\Delta$ 34.5 en fonction du type cellulaire infecté. Les virus délétés du gène  $\gamma$ 34.5 ne peuvent inhiber l'activité de la PKR et ainsi empêcher l'arrêt de la synthèse protéique. Cependant, les cellules tumorales qui surexpriment la MAP kinase (MEK) sont moins permissives à la réplication de ces virus mutés grâce à l'inhibition de la PKR par MEK (196, 216). De même, des cellules cancéreuses surexprimant la PI3 kinase, montrent une permissivité accrue à l'infection par un virus HSV-1 $\Delta$ 34.5. En effet, la PI3 kinase, en phosphorylant la protéine GSK-3, maintient l'activité du facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$ . L'activation, aussi bien que l'inhibition, de la voie de signalisation Ras, n'ont pas d'effet sur la capacité de réplication d'un virus HSV-1 $\Delta$ 34.5(187). Néanmoins, l'inhibition de la voie RAS dans des cellules NIH-3T3 augmente la multiplication d'HSV-1 sauvage de manière dépendante de l'activité PKR (58). Une autre étude montre qu'un virus HSV-1 $\Delta$ 34.5 induit une mort par apoptose indépendante de p53 dans différentes lignées chimio-résistantes de cellules du cancer de l'ovaire (45).

Les virus atténués, grâce à leur très faible toxicité, ont pu bénéficier d'expérimentations poussées et servent à mettre en valeur différents paramètres de l'infection oncolytique. Bien que ne pouvant pas être généralisés aux virus oncolytiques ciblés plus virulents, les résultats de ces expériences fournissent des repères et des normes physiologiques dans lesquelles l'infection oncolytique peut se dérouler. Ainsi, un virus HSV-1 $\Delta$ 34.5 en phase clinique I pour traiter des métastases hépatiques du cancer du colon, a montré une faible toxicité hépatique caractérisée par une faible augmentation sérique des enzymes hépatiques et l'absence de signes cliniques relatifs. Ce virus, injecté dans l'artère hépatique à très forte dose, n'a pas montré de dissémination importante dans l'organisme, démontrant l'avantage pharmacologique de cette voie d'injection grâce à l'efficacité de la clairance hépatique. Les auteurs ont également analysé les paramètres cardiaques, gastro-intestinaux, ou la présence de fièvre et de maux de tête, pour conclure que le traitement n'avait pas de conséquences dommageables pour l'organisme (105). Plus précisément, dans le cas des HCC, une étude a montré l'efficacité du virus G207 sur différentes lignées de cellules d'HCC, en évaluant la réplication virale grâce à des courbes de croissance à faible multiplicité et la toxicité en dosant la fuite de LDH (lactate déshydrogénase) dans le milieu extracellulaire. Ils concluent que les lignées d'HCC HepG2 et Hep3B sont extrêmement permissives à l'infection par G207 (93 et 83% de cellules mortes à 7 jours post-infection (jpi) à une multiplicité d'infection de 0,1 particules par cellule). D'autres lignées d'HCC sont plus résistantes, voire ne subissent aucune toxicité. Après infection à m.o.i. 0,01, la charge virale était augmentée de 800 fois dans les cellules Hep3B à 5jpi et de 10 fois à 7jpi à m.o.i. 0,1 pour les cellules HepG2 (197). En phase I, Le G207 a été testé en injection intratumorale de gliome à la dose de  $3.10^9$  pfu sans provoquer d'encéphalite (134).

Pour comprendre les limites d'utilisation des virus atténués en thérapie oncolytique, il est intéressant de suivre l'évolution du volume de la tumeur après traitement (indicateur du taux de mortalité des cellules tumorales) et, dans le même temps, la courbe de production virale qui indique la propagation du virus dans la masse tumorale et par extension la nature de la mort cellulaire (apoptose, nécrose). L'étude de Chung et collaborateurs montre l'évolution simultanée de ces deux paramètres lors d'infection avec un virus HSV-1 multidéléte (HSV-1 $\Delta$ ICP0/ $\Delta$ 34.5/ $\Delta$ UL55-56) testé pour la lyse de xénogreffe d'HCC (Huh7 et Hep3B) sur souris immunodéficientes. Comme lors d'infection avec tout virus HSV-1 atténué, la progression du volume de la tumeur est ralentie par rapport à la tumeur infectée mais néanmoins le volume continue de progresser jusqu'à l'euthanasie de l'animal. Au cours de cette expérience, on observe que le virus atténué s'amplifie faiblement dans la masse tumorale et, à partir du 7<sup>ème</sup> jour, la cinétique de réplication dans la tumeur s'inverse pour atteindre un titre de virus inférieur à celui qui a servi à l'inoculation (39). L'infection par les virus HSV-1 atténués, à plus forte raison s'ils expriment des transgènes cytotoxiques, est une infection limitée par les réponses antivirales non réprimées. Par conséquent, elle se développe probablement moins longtemps et permet une production de virus moins importante que l'infection avec un virus sauvage.

Parmi les fonctions virales utilisées pour contrer la réponse antivirale cellulaire, les fonctions anti-apoptotiques retardent la progression de l'apoptose induite par l'infection et permettent au virus d'augmenter sa production (109). Certaines cellules cancéreuses conservent la propriété d'induire l'apoptose et ainsi de diminuer la production d'un virus déficient en fonction anti-apoptotique (45). Un virus HSV-1 $\Delta$ Us3 a été testé sur

xénogreffe de gliome de souris athymiques (127). La progression de la tumeur est ralentie avec le virus HSV-1 $\Delta$ Us3 mais continue néanmoins de progresser. Les auteurs soulignent deux points positifs : le virus HSV-1 $\Delta$ Us3 est sûr pour la santé de l'animal traité et les cellules de la tumeur infectée sont sensibilisées à la mort apoptotique induite par un inhibiteur de la voie PI3 kinase-Akt. La perte d'Us3 confère donc une spécificité tumorale à l'infection HSV-1, essentiellement en évitant l'infection des tissus sains mais réduit ses capacités de réplication. En conclusion, la protéine Us3 est nécessaire dans ce contexte pour augmenter l'effet oncolytique du virus HSV-1.

D'après ces différents résultats, on peut considérer que les virus atténués ne répriment pas suffisamment les réponses antivirales persistantes dans les cellules cancéreuses, ce qui entraîne une diminution de la production de virus par cellule infectée. Les premières cellules infectées meurent, faisant ralentir la croissance tumorale. Cependant, la production de virus étant insuffisante, la croissance tumorale reprend ensuite. Au regard des résultats expérimentaux obtenus avec les différents virus HSV-1 atténués, il apparaît qu'aucun gène HSV-1 ne peut être supprimé sans rendre cliniquement inintéressante son utilisation en tant qu'agent oncolytique (125).

Le génotypage des tumeurs permet de mettre en évidence la sur- ou sous-expression de protéines impliquées dans les réponses cellulaires à l'infection HSV-1. Bien que ces virus atténués conservent l'avantage d'être sûrs pour l'organisme, leur manque d'efficacité et, par conséquent, leur association quasi systématique à la chimiothérapie ou à la radiothérapie qui provoquent effets secondaires et résistances, appelle à la mise au point d'autres stratégies oncolytiques pour que les virus HSV-1 acquièrent une place dans les traitements anticancéreux. Des virus oncolytiques plus agressifs vis à vis de la tumeur, mais strictement ciblés, devraient permettre de détruire l'ensemble des cellules cancéreuses sans infecter ou se multiplier dans les cellules saines, permettant d'éviter ainsi des traitements anticancéreux classiques.

### **C. Virus HSV-1 oncolytiques ciblés**

Le tropisme d'un virus se joue au niveau de chaque interaction entre protéines cellulaires et protéines virales. Le ciblage d'un virus peut avoir lieu au niveau de la pénétration, de l'expression génique, ou de la réplication du génome, et plusieurs équipes travaillent actuellement sur ces différentes voies. Dans la mesure où mon travail de thèse est centré sur le ciblage transcriptionnel du virus oncolytique, ce chapitre détaillera les concepts et les expériences relatifs à ce type de ciblage.

Les virus HSV-1 $\Delta$ 34.5 ayant montré une activité oncolytique prometteuse, le gène 34.5 fut le premier gène HSV-1 ciblé. Le clonage de ce gène sous le contrôle du promoteur B-myb, introduit dans un génome d'HSV-1 délété des gènes 34.5 et ICP6, a permis d'augmenter la production de virions par rapport à celle du génome parental dans des cellules de gliomes. La production est supérieure à celle du virus  $\Delta$ 34.5. Le promoteur cellulaire B-myb est un promoteur régulé par le cycle cellulaire et activé dans les cellules en division. La LD50 (dose entraînant la mort dans 50% des cas) après injection intracrânienne des souris est équivalente à celle du virus HSV-1 $\Delta$ 34.5 à  $10^7$  particules, mais cette activité confère au virus Myb34.5 une réplication différentielle plus ample entre fibroblastes quiescents et en division que pour le virus délété. L'effet oncolytique in vivo est semblable pour ces deux virus (38). Sur un modèle de métastase diffuse du

foie, le virus Myb34.5 montre une augmentation de l'espérance de vie des souris, une toxicité équivalente à celle du virus  $\Delta$ 34.5 et un titre dans les tumeurs équivalent au virus HSV-1 sauvage. Au delà, le virus a été retrouvé de manière transitoire dans les 3 premiers jours post infection dans les tissus sains de la rate et du foie après injection intraportale (155).

Pour augmenter la spécificité tumorale, un virus similaire, doublement délété des gènes 34.5 et ICP6, a été construit en ciblant l'expression d'ICP34.5 avec le promoteur du gène nestin, actif spécifiquement dans les gliomes. L'expression spécifique dans les gliomes de la protéine nestin a été testée par RT-PCR. La réexpression de ICP34.5 sous contrôle de ce promoteur a permis d'élargir le champ d'activité oncolytique à des gliomes ne surexprimant pas la MAPK. Ce virus a permis aussi d'augmenter l'espérance de vie chez des souris montrant déjà des signes cliniques dûs à la progression de la tumeur (94). Ces virus ont une expression ciblée de 34.5 qui augmente l'oncolyse tout en maintenant une cytotoxicité acceptable. Néanmoins, le fait que ce virus soit doublement muté entraîne aussi un certain degré d'atténuation. Le ciblage de l'expression d'un gène associé à la délétion d'un autre gène produit un effet oncolytique intermédiaire entre celui du virus doublement délété et celui du virus sauvage. La maîtrise de la cytotoxicité est obtenue grâce à l'atténuation et au ciblage transcriptionnel. Ces virus, en étude préclinique, montrent de très intéressantes diminutions de la croissance tumorale mais néanmoins les animaux traités meurent des conséquences de l'augmentation du volume de la tumeur.

Un virus pour lequel la transcription d'ICP4 est régulée par un promoteur répondant à une activation de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -catenin permet de stabiliser la taille d'une tumeur colorectale surexprimant cette voie (110). L'effet oncolytique est alors comparable à celui obtenu par un virus  $\Delta$ ICP6. L'effet oncolytique est perdu si la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -catenin n'est pas suffisamment activée. Les auteurs montrent une variation de la synthèse d'ICP4, en fonction du degré d'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -catenin, qui se traduit par une plus ou moins forte capacité de réplication. Cette étude confirme l'efficacité du ciblage transcriptionnel et montre que l'effet lytique est dépendant de la quantité de la protéine virale ciblée. Sur le même schéma, un promoteur artificiel construit pour répondre à la voie de signalisation Ras a également été validé comme promoteur de ciblage en montrant, dans le génome HSV-1, une activité spécifique des situations de surexpression de Ras. Ces promoteurs artificiels sont qualifiés de « Signal Smart » car ils répondent précisément à la biochimie de signalisation active dans la cellule tumorale infectée. Les gènes Ras et Wnt/ $\beta$ -catenin sont des proto-oncogènes dont on peut supposer une activation uniforme au sein de la tumeur et par conséquent une lyse de l'ensemble des cellules tumorales par le virus ciblé. Un autre promoteur inductible artificiel, composé d'éléments de réponse à l'hypoxie (promoteur HRE : hypoxia reponsive element) qui lie le facteur de transcription induit par l'hypoxie HIF (hypoxia inducible factor) a été utilisé pour cibler l'expression de la protéine ICP6. La transfection des cellules de tumeurs de carcinome du colon avec un plasmide exprimant le gène ICP6 sous contrôle de 10 motifs HRE amplifie l'activité lytique d'un virus HSV-1 $\Delta$ ICP34.5/ $\Delta$ ICP6 (177).

Les promoteurs cellulaires, sélectionnés sur base de leur activité transcriptionnelle, sont des promoteurs qui peuvent ne pas être actifs dans toutes les tumeurs, voire dans toutes les cellules d'une même tumeur. Ainsi, le promoteur de la télomérase, hTERT, n'est réactivé au début du processus de cancérogénèse que dans 3%

des cellules d'HCC non différenciés, mais également dans 0,2% des hépatocytes lors d'une hépatite chronique, ce qui limite l'utilisation de ce promoteur en dehors des phases précoces du HCC et des cas fréquents de pathologies hépatiques chroniques environnant la tumeur (103). La réactivation du promoteur AFP (Alpha Foeto Protein) dans les hépatomes, résulte d'une compétition entre la protéine inhibitrice ATBF1 et le facteur HNF1 au niveau d'un site de liaison commun dans l'enhancer (112). Elle est donc une conséquence du métabolisme cancéreux et, de même que pour hTERT, n'est pas présente dans tous les HCC (210). Les cellules prénéoplastiques d'HCC peuvent également réactiver AFP. Par ailleurs, l'hypoxie, qui peut apparaître dans les tissus tumoraux mal irrigués, est une condition qui peut réprimer l'activité du promoteur AFP (138). Un promoteur artificiel formé par un promoteur AFP et des éléments HRE, et qui possède une activité promotrice aussi bien en normoxie qu'en hypoxie, peut résoudre cette situation (84). Il est intéressant, dans le cas du traitement des HCC, de posséder une alternative au promoteur AFP dans le cas des HCC AFP négatifs, comme celle offerte par le promoteur du gène Midkine (210) ou celui de l'ANGPTL-3. Les promoteurs cellulaires, bien que possédant des qualités limitées, peuvent se révéler très intéressants si on personnalise le traitement jusqu'à extraire le promoteur actif de la tumeur à traiter. Dans ce sens, l'observation de polymorphismes d'un seul nucléotide dans le promoteur AFP a permis d'isoler 3 phénotypes différents d'HCC : un taux élevé d'AFP sérique, un risque élevé de développement du HCC, ou une association de ces deux paramètres (37). L'étude de Tanabe et collaborateurs (153) expose clairement les étapes élémentaires qui permettent de valider l'utilisation d'un promoteur cellulaire pour cibler la réplication virale. Différentes séquences régulatrices issues du promoteur du gène CEA (antigène carcino-embryonnaire) ont été clonées en amont du gène rapporteur luciférase et les plasmides ont été transfectés dans différentes lignées cellulaires de carcinome du colon exprimant le CEA en différentes quantités. Les hépatocytes sont utilisés comme contrôle CEA négatifs. Les auteurs ont choisi le promoteur montrant la plus faible activité transcriptionnelle dans les hépatocytes afin de favoriser la spécificité tumorale. Ce promoteur a été utilisé pour cibler l'expression des gènes ICP34.5 ou ICP4 dans un virus HSV-1 $\Delta$ ICP6. Contrairement à ce qui pouvait être attendu, le virus CEA-ICP4/ $\Delta$ ICP6 est incapable de se répliquer dans 2/3 des cellules exprimant un fort niveau de CEA, de même que le virus  $\Delta$ ICP4 mais contrairement au virus  $\Delta$ ICP6, qui maintient une réplication presque équivalente dans toutes les lignées, y compris la lignée contrôle VERO. Le virus CEA-ICP34.5 se réplique à un taux équivalent aux virus  $\Delta$ 34.5/ $\Delta$ ICP6 et  $\Delta$ ICP6.

La même équipe est parvenue à obtenir un virus ayant une différence de réplication d'un facteur 10 entre deux lignées de cellules exprimant faiblement ou fortement l'antigène associé aux tumeurs MUC1/DF3 (97). En utilisant un virus délété du gène de TK, ils ont ciblé l'expression du gène 34.5 en le mettant sous la dépendance du promoteur MUC1/DF3. Ce virus montre une activité cytotoxique plus importante que le virus sauvage, et identique au virus  $\Delta$ ICP6, dans les lignées cellulaires exprimant MUC1/DF3 par rapport aux lignées de cellules cancéreuses ou VERO n'exprimant pas MUC1/DF3. Les xénogreffes de cellules positives pour MUC1/DF3 ont une croissance réduite après infection par le virus HSV-1 $\Delta$ TK/MUC1/DF3-34.5. Une étude in vivo de ce virus (97) sur un modèle de xénogreffe sur souris athymique de carcinome du colon montre une réduction du volume de la tumeur exprimant MUC1/DF3 plus importante que celle obtenue avec les virus contrôles  $\Delta$ TK ou  $\Delta$ ICP34.5/ $\Delta$ ICP6. Dans les tumeurs n'exprimant pas MUC1/DF3, le virus  $\Delta$ TK permet de stabiliser la croissance tumorale. Néanmoins, la présence du gène TK est une sécurité nécessaire pour contrôler la

propagation du virus HSV-1 car elle permet d'utiliser les drogues antivirales du type Acyclovir. En l'absence de stratégie de ciblage sûre, dans aucune stratégie thérapeutique, il n'est envisagé d'utiliser un virus HSV-1 $\Delta$ TK. Ces résultats montrent la possibilité d'adapter les capacités répliquatives et lytiques d'HSV-1 à un type cellulaire particulier. L'absence du contrôle négatif  $\Delta$ TK/ $\Delta$ ICP34.5 ne permet pas de conclure à l'avantage du ciblage par rapport à la délétion d'ICP34.5 seule. Enfin, en ce qui concerne les promoteurs cellulaires, on peut ajouter que la méthylation aberrante des séquences régulatrices dans les cellules tumorales peut être responsable de leur réactivation. L'utilisation de tels promoteurs offre aussi des possibilités pour le ciblage des HSV-1 oncolytiques (232).

Une stratégie alternative très intéressante et qui a donné des bons résultats est celle qui consiste à utiliser les promoteurs spécifiques de tumeur dans un système oncolytique de type amplicon - virus auxiliaire. L'inoculation de vecteurs défectifs de type amplicon exprimant la protéine essentielle ICP4 sous le contrôle d'un promoteur spécifique du cancer de la prostate permet la multiplication par complémentation d'un virus non répliquatif défectif pour ICP4 dans les cellules de cancer de la prostate. Le ciblage est obtenu par l'activité spécifique du promoteur et également de manière physique par l'injection localisée des amplicons. En effet, ce dernier ne se multipliant pas, l'expression de la protéine ICP4 et donc de l'infection est limitée au site d'injection intratumorale (115).

De nombreuses étapes du cycle de réplication virale sont sujettes à des variations entre individus et au sein d'un même individu. Du fait de la plasticité de son interactome (et de sa complexité), la variation au niveau de la transcription a un effet limité sur l'effet oncolytique. Inversement, cette variation doit probablement rester à l'intérieur de certaines limites pour ne pas handicaper le cycle de multiplication virale. La variation d'efficacité au niveau de la transcription est dépendante principalement de la nature du promoteur et du bruit de fond génétique de la souche virale utilisée, mais également du type cellulaire et de la présence ou non de facteurs de transcription à un moment donné du cycle. Le ciblage transcriptionnel des gènes HSV-1 nécessite une analyse des paramètres de l'activité des promoteurs qui contrôlent ces gènes et notamment de leur force et de leur cinétique. La quantité de certaines protéines virales est susceptible d'influencer la réplication et la production de virus HSV-1 ciblés (110). La sensibilité et la spécificité du mode de sélection des promoteurs sont donc très importantes. En effet, si la présence d'AFP sérique est observée dans 70% des HCC, les analyses par Northern blot détectent beaucoup moins fréquemment les ARNm d'AFP (210). Une étude portant sur la sélection de promoteurs cellulaires spécifiques des cellules de gliome utilise la RT-qPCR et le système luciférase (68). Les promoteurs ainsi sélectionnés montrent un nombre de copies de transcrits correspondants plus élevé dans les cellules de gliome que dans les fibroblastes. Ces promoteurs ont été clonés en amont de la luciférase dans un plasmide ou dans une région intergénique du génome HSV-1. Les auteurs observent que l'activité des promoteurs est moins forte dans le contexte viral que dans le contexte plasmidique, probablement en raison d'une inhibition de l'activité des facteurs de transcription cellulaires par l'infection HSV-1. Une analyse des facteurs de transcription cellulaires et viraux participant à la régulation des promoteurs cellulaires clonés dans le génome HSV-1 est donc nécessaire pour comprendre et améliorer la sélection des promoteurs de ciblage. Dans ce sens, l'étude des variations de l'expression génique cellulaire et l'activation des voies de signalisation engendrées par l'infection HSV-1 peut

apporter un complément d'information permettant de restreindre la choix des promoteurs cellulaires ou de décider de la construction des promoteurs artificiels (128, 133, 186).

Enfin, pour augmenter l'efficacité des promoteurs de ciblage, il peut être suggéré que leur activité mime celles des promoteurs viraux dans les cellules tumorales en terme de cinétique d'activation et d'activité maximale. En effet, si on admet que l'effet cytopathogène maximale est obtenu avec le promoteur sélectionné par HSV-1 au cours de son évolution, le promoteur cellulaire utilisé pour le ciblage devra reproduire au mieux la forme de l'activité du promoteur viral dans les cellules tumorales. Le choix du gène viral à cibler dépendra de sa fonction et peut être rationalisé sur la base de l'activité des promoteurs cellulaires disponibles. Dans ce sens une étude préalable a caractérisé la cinétique de promoteurs tardifs et très précoces d'HSV-1 dans des cellules tumorales en utilisant le système luciférase. Les résultats de ce travail montrent que le système luciférase est particulièrement efficace pour étudier au moins deux étapes du processus infectieux : l'infection proprement dite, avec le début de l'expression des gènes très précoces, et la réplication de l'ADN, avec l'expression des gènes tardifs. Ils suggèrent également que les promoteurs à activité tardive sont préférables aux promoteurs à activité très précoce pour contrôler l'expression de gènes thérapeutiques (100). Un important effort de modélisation reste à fournir pour rationaliser l'utilisation des promoteurs de ciblage.

Au regard de l'évolution des différentes thérapies anticancéreuses, la résistance tumorale vis à vis de l'infection est un phénomène qui doit être pris en considération dès maintenant dans l'élaboration des essais cliniques et précliniques de virus oncolytiques. La résistance à l'infection oncolytique est une notion complexe et encore fragile qui concerne la limitation de la propagation du virus dans la masse tumorale par des barrières mécaniques, l'inhibition de la réplication par les fonctions cellulaires, la clairance hépatique et la réponse immune antivirale. Au niveau cellulaire, la susceptibilité de certains types cellulaires à l'infection HSV-1 (permissivité) peut limiter également la multiplication et la dissémination du virus. Les études menées sur de nombreux types de cancer ont permis d'isoler une sous population de cellules dont les caractéristiques ont conduit à l'élaboration de la théorie des cellules souches cancéreuses (CSC). Par définition, les CSC partagent des caractéristiques des cellules souches normales. Les CSC expriment ainsi des gènes de résistance aux chimiothérapies et à l'irradiation ainsi qu'un potentiel de différenciation. Le terme de cellules initiatrices de cancer (CIC), moins controversé, a été récemment proposé en remplacement du terme de CSC. Si aucune donnée ne permet d'affirmer que ces cellules sont à l'origine de la tumeur primaire, les expériences qui les ont révélés suggèrent que leur résistance naturelle forte joue un rôle dans la réapparition des tumeurs après traitement. Dans le cas du gliome, cette sous-population cellulaire est caractérisée par l'expression du marqueur CD133, de la protéine nestine, par un potentiel de différenciation et une tumorigénicité évalués par xénogreffe orthotopique sur souris immunodéficientes (222), ainsi que par des mécanismes suractivés de réparation de l'ADN. Ces CIC de gliome supportent différemment l'infection par les virus HSV-1 oncolytiques avec, par ordre décroissant d'efficacité lytique, le virus HSV-1 sauvage suivi du virus atténué G207. La réponse interféron particulièrement forte et efficace des CIC pourrait être une caractéristique unique de ces cellules au sein de la masse tumorale. Un traitement à l'interféron  $\beta$  inhibe 99,99% de la réplication du virus nestin-34.5 dans des cultures de CIC par rapport à la réplication de ce virus dans des lignées de cellules de gliome (163).

Néanmoins, parce que les virus ne sont pas sensibles aux mécanismes responsables des résistances aux chimiothérapies et à l'irradiation, ils sont potentiellement des outils efficaces pour détruire les CIC.

Enfin, il convient de noter une méthode de ciblage post-transcriptionnel potentiellement très intéressante, qui consiste à insérer une séquence cible d'un miRNA spécifique de tissu au niveau de la séquence d'un gène viral essentiel. L'ARNm de ce gène sera détruit dans les cellules exprimant le miRNA et le virus ne pourra pas s'y multiplier. Les cellules n'exprimant pas ou peu le miRNA, par contre, seront permissives à l'infection. Il s'agit dans ce cas d'une stratégie dite de « detargeting » dans la mesure où elle empêche la multiplication virale dans tout tissu sain qui exprime ce miRNA. Ce miRNA étant réprimé dans la tumeur, le virus pourra se répliquer et détruire les cellules cancéreuses. Une preuve de concept a été établie avec le ciblage de l'expression du gène codant pour ICP4 par l'addition de copies de séquences cibles de miR-143 ou de miR-145 dans l'extrémité 3' de l'ARNm du gène viral. Ces miRNA s'expriment naturellement dans la plupart des tissus sains mais pas dans les cellules de cancer de la prostate. Les auteurs ont montré que, suite à l'implantation d'une tumeur de prostate dans des souris athymiques, la surinfection avec le virus portant le gène ICP4 ainsi modifié reste localisée dans le tissu tumoral et ne se dissémine pas dans les tissus sains (116).

Rechercher l'équilibre entre toxicité et spécificité est le défi de la virothérapie oncolytique. Le concours de plusieurs méthodes de ciblage et de plusieurs gènes à cibler semble aujourd'hui une voie possible pour atteindre cet objectif. Le modèle de l'infection oncolytique n'est pas encore suffisamment détaillé pour permettre de prédire le ou les gènes HSV-1 à cibler. L'infection des modèles tumoraux avec les virus oncolytiques prototypes reste la seule méthode qui permettra de valider les couples gènes viraux-promoteurs de ciblage les plus adéquats.

## **Objectifs de mon travail de thèse. Le projet THOVLEN.**

L'objectif central de mon travail de thèse a été de contribuer au développement de vecteurs HSV-1 oncolytiques, ciblés au niveau transcriptionnel, pour le traitement des hépatocarcinomes (HCC). La totalité de ce travail s'inscrit dans le cadre d'un vaste projet européen dénommé THOVLEN (Targeted Herpesvirus Oncolytic Vectors for Liver cancer European Network). Ce projet, auquel ont participé 7 laboratoires européens depuis janvier 2006 jusqu'en juin 2009, avait pour objet d'explorer différentes voies de ciblage d'un virus HSV-1 oncolytique, afin de permettre à ces virus de déployer une toxicité sélective pour les HCC, tout en épargnant les hépatocytes et d'autres cellules normales. Ce projet se divisait en 3 chapitres ou "workpackages", pour utiliser les termes des projets européens.

Le premier chapitre avait pour but de développer une étude systémique comparative, au niveau du protéome et du transcriptome, des cellules d'HCC et des hépatocytes sains, infectées ou non par des HSV-1 compétents pour la réplication. La finalité de cette étude était double. Il s'agissait, d'une part, d'identifier des modifications dans le profil d'expression des protéines cellulaires, et du métabolisme cellulaire, induites par l'infection par un HSV-1 réplicatif, et d'autre part, de concevoir et de produire un virus oncolytique, pouvant exploiter rationnellement ces modifications. Ainsi, par exemple, cette étude protéomique nous a permis de montrer que l'HSV-1 induisait l'activation de nombreuses protéines cellulaires, ainsi que des modifications au niveau de la régulation des processus apoptotiques dans les HCC. Cette observation a été utilisée par la suite pour générer des virus oncolytiques modulant l'apoptose dans les cellules d'hépatome, de manière à permettre au virus oncolytique d'accomplir son cycle seulement dans ces cellules et de se disséminer au sein de la tumeur.

Le deuxième aspect de ce premier chapitre était d'identifier, via une approche transcriptomique, des promoteurs cellulaires spécifiquement actifs dans les cellules HCC, mais pas dans les hépatocytes, et susceptibles de rester actifs ou d'être activés, après infection par un HSV-1 réplicatif, voire après clonage de ces promoteurs dans le génome du virus oncolytique lui-même. Cette stratégie était nécessaire pour notre programme, car il est bien connu que l'infection par HSV-1 s'accompagne de l'inhibition de la plupart des promoteurs cellulaires, suite à la répression de la synthèse ou à la dégradation de facteurs de transcription cellulaires. Ainsi, nous avons étudié plusieurs promoteurs susceptibles de présenter ces critères, et nous en avons identifié d'autres pendant ce projet, ce qui sera développé dans le corpus de mon travail de thèse.

Le deuxième chapitre de THOVLEN a été la construction, la production et l'évaluation, en culture de cellules, de différents types de virus HSV-1 recombinants, conçus pour explorer différentes stratégies de ciblage de la multiplication et de la dissémination oncolytique. Au moins trois niveaux de ciblage sont possibles et ont été étudiés au cours de ce programme : (i) le ciblage au niveau de la pénétration du virus, par modification des glycoprotéines virales de surface, (ii) le ciblage transcriptionnel, où un gène viral est mis sous le contrôle d'un promoteur spécifique de cancer, et plus particulièrement de promoteurs actifs dans des HCC, et (iii) le ciblage post-transcriptionnel, par l'introduction dans la région 3' UTR d'un ARNm viral, d'une séquence cible d'un miRNA spécifique d'un type cellulaire, capable donc d'induire la destruction ou l'inhibition de la traduction de cet ARNm dans les cellules non ciblées.

Alors que la première et la troisième stratégie de ciblage ont été développées surtout par d'autres équipes du réseau THOVLEN, mon travail de thèse a consisté donc à explorer les possibilités de ciblage au niveau de la transcription. Pour ce faire, j'ai construit une série de virus HSV-1 recombinants, réplicatifs ou défectifs, dans lesquels j'ai introduit un gène rapporteur (la luciférase de luciole) sous contrôle de différents promoteurs, et j'ai étudié l'intensité et la cinétique d'expression de la luciférase dans différents types cellulaires. Certains promoteurs que nous avons choisis pour cette étude sont actifs dans plusieurs types de cellules cancéreuses (promoteur de la sous-unité transcriptase reverse de la télomérase hTERT et promoteur 9xHRE, spécifiquement activé dans des conditions d'hypoxie), d'autres promoteurs sont spécifiques de cellules en prolifération active (E2F1), ou ont été décrits comme étant actifs au moins dans certaines lignées d'HCC (promoteur AFP). D'autres promoteurs, enfin, ont été identifiés dans le premier chapitre de THOVLEN, par l'approche transcriptomique décrite plus haut. Parmi eux, les promoteurs de l'angiopoïétine-like de type 3 (ANGPTL3), de l'alcool déshydrogénase de type 6 (ADH6), et de l'apolipoprotéine B (ApoB). En tant que contrôles, nous avons utilisé les promoteurs du gène très précoce du virus cytomégalique humain (hCMV), ainsi que le promoteur d'un gène précoce d'HSV-1, le promoteur du gène Us3. Les différentes cassettes de transcription **promoteur-luciférase** ont été introduites dans une région intergénique du virus HSV-1, toujours dans la même orientation. Nous avons ensuite étudié leur activité et leur cinétique dans des cellules d'hépatome, dans des lignées cellulaires en provenance d'autres cancers, dans des cellules non tumorales et, enfin, dans des hépatocytes primaires humains.

Dans la deuxième étape de mon travail de thèse, nous avons choisi deux de ces promoteurs, ANGPTL3 et 9xHRE, et nous les avons séparément placés en amont du gène viral Us3, dans le contexte d'un génome viral dans lequel nous avons préalablement délété le gène Us3. La finalité de cette approche est de construire un virus potentiellement oncolytique en utilisant le ciblage de ce gène au niveau de la transcription. Le gène Us3 a été choisi parce que, tel qu'il a été exposé au début de ce document, il semble jouer un rôle particulièrement important dans la capacité d'HSV-1 à inhiber l'apoptose induite par l'infection virale. En plaçant donc ce gène sous le contrôle d'un promoteur qui ne s'exprime fortement que dans les cellules d'HCC, nous cherchions à inhiber l'apoptose spécifiquement dans ces cellules, permettant donc au virus d'accomplir son cycle et se disséminer. Dans les hépatocytes, par contre, le fait qu'Us3 ne s'exprime pas, devrait conduire à une expression non modulée du phénotype pro-apoptotique, provoquant la mort précoce de la cellule infectée et l'arrêt de la multiplication virale.

Enfin, le troisième chapitre de THOVLEN avait pour but d'évaluer un groupe réduit de virus recombinants construits par moi-même ou par d'autres partenaires de THOVLEN, dans des modèles animaux d'HCC, afin de tester leur expression, leur toxicité et leur pouvoir oncolytique *in vivo*.

Ma contribution au travail de ce réseau a donc été essentielle pour la réalisation du deuxième chapitre du programme, à savoir l'analyse de l'expression des différents promoteurs à partir du génome viral et la construction d'un virus potentiellement oncolytique en utilisant certains de ces promoteurs pour cibler l'expression du gène Us3. J'ai également participé, bien que de manière moins importante, aux chapitres premier (identification de promoteurs) et dernier (évaluation *in vivo* de l'activité de ces promoteurs, exprimés à partir du génome viral).

# MATERIEL ET METHODES

## 1. Cellules

Toutes les cellules sont adhérentes. Les lignées de cellules **VERO** (cellules épithéliales de rein de singe vert d'Afrique), **VERO7b** (cellules VERO exprimant constitutivement le gène viral ICP4), **HeLa** (cellules épithéliales humaines d'adénocarcinome du col de l'utérus), **Gli36** (gliome malin humain), **HepG2** (hépatoblastome humain), **Hep3B** (hépatocarcinome humain), **HepaRG** (lignée établie dérivée d'hépatome différencié de grade I) (73) et **WRL68** (lignée établie de cellules épithéliales de foie embryonnaire humain) sont cultivées dans du milieu DMEM + 4,5g de glucose/L (sans pyruvate) supplémenté par 10% de SFVI (sérum fœtal de veau inactivé) et 1% pénicilline-streptomycine à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. La lignée de cellule **Huh7** (hépatocarcinome humain) est entretenue dans les mêmes conditions, mais le milieu DMEM est complété en pyruvate (110mg/L).

## 2. Virus

Nous avons utilisé la souche répliquative HSV-1-Glasgow17+/Cgal+ (notée Cgal+), exprimant le gène de la  $\beta$ -galactosidase sous contrôle du promoteur hCMV à partir de la région intergénique 52 (IGR52) (171), et la souche non répliquative HSV-1-D30EBA (notée D30EBA), dérivée de la souche Glasgow17+ mais n'exprimant pas la protéine ICP4 (171). Le vecteur BAC-HSV-1, contenant le génome complet de la souche HSV-1 Glasgow 17+, nous a été offert généreusement par Dr. David Leib (66). La souche Cgal+ et les virus recombinants dérivés de cette souche ont été produits et titrés sur les cellules VERO. Le virus D30EBA et les virus recombinants dérivés de cette souche ont été produits et titrés avec les cellules VERO7b (91).

## 3. Infection avec les virus HSV-1

Les cellules sontensemencées dans des boîtes de culture et cultivées dans du milieu DMEM jusqu'à confluence. Les cellules sont alors infectées pendant 2 heures par l'inoculum viral à différentes multiplicités d'infection (m.o.i.) puis elles sont lavées une fois avec du PBS avant d'être recouvertes par du milieu (M199 contenant 1% de SFVI) et incubées à 34°C sous 5% de CO<sub>2</sub> jusqu'à l'arrêt de l'infection. L'infection est arrêtée à des temps différents, en fonction des tests qui seront réalisés. Pour les titrages et les tests luciférase, les cellules sont prélevées par grattage dans 1 ml de milieu de culture puis congelées à - 80°C. Pour les Western blots, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS froid avant d'être prélevées par grattage.

## 4. Promoteurs et plasmides

Le plasmide **pGl3basic** (Promega) contient l'ORF de la luciférase de luciole en aval d'un site de clonage multiple, sans promoteur. Il a été utilisé pour introduire différents promoteurs générant ainsi les plasmides d'expression de la luciférase. Le promoteur de l' $\alpha$ -foetoprotéine (AFP) correspond à la séquence enhancer et la séquence promotrice contenant la boîte TATA. La séquence enhancer correspond à un fragment de 408pb (HindIII-HaeIII) situé entre -3,7 et -3,3 kb dans la région 5' du gène AFP, tel que défini

par Watanabe et collaborateurs (225). La séquence promotrice correspond au fragment de 168pb (SacI-NcoI) situé 44pb en amont de l'ORF du gène AFP. La séquence enhancer est clonée dans son orientation inverse. Le fragment enhancer-promoter AFP (NheI-NcoI) (1000pb) est cloné dans le site HindIII du plasmide pGI3 basic, en amont de l'ORF de la luciférase pour obtenir le plasmide d'expression **pGI3 AFP**. Un fragment de 269pb du promoteur E2F1 a été obtenu par PCR à partir du plasmide pSEHE2F (80) grâce à l'utilisation des primers 5' TACTGTAACATAACGGTCCTAAGGTAGGGATGGTACCATCCGGACAAAGCC-3' et 5'-TAAGTATTTAAATGGCGAGGGCTCGATCCCCG-3'. Il a ensuite été cloné dans le site HindIII du plasmide pGI3 basic pour obtenir le plasmide d'expression **pGI3 E2F1**. Le promoteur hTERT est obtenu à partir du plasmide pBT-SE (82) par digestion avec les enzymes de restriction KpnI et HindIII puis cloné dans le site HindIII de pGI3 basic pour obtenir le plasmide d'expression **pGI3 hTERT**. Le promoteur utilisé pour augmenter l'expression génique dans les conditions d'hypoxie est constitué de 9 unités HRE (hypoxia responsive element) de séquence TCGACCACAGTGCATACGTGGGCTCCAACAGGTCCTCTTC clonées bout à bout en amont du promoteur de la prolactine de rat. La cassette est clonée dans le site HindIII du plasmide pGI3 basic pour obtenir le plasmide d'expression **pGI3 9xHRE**. Le promoteur hCMV provient du plasmide commercial pCMV-GLuc Control (New England Biolabs). Le promoteur est cloné dans le site HindIII du plasmide pGI3 basic, pour obtenir le plasmide d'expression **pGI3 hCMV**. Les promoteurs ANGPTL3 et ADH6 ont été clonés et utilisés pour construire les plasmides **pGI3 ANGPTL3** et **pGI3 ADH6** comme indiqué dans l'article 1 en annexe.

Le plasmide de recombinaison **pIGR20** a été construit dans l'équipe du Pr. Roberto Manservigi à l'Université de Ferrara (Italie). La séquence correspondant à la région intergénique 20 (IGR20), située entre les ORF des gènes UL26 et UL27 d'HSV-1, a été obtenue par digestion de l'ADN viral du virus Cgal+ par les enzymes NotI et BamHI. Le fragment correspondant à l'IGR20 a été cloné dans le plasmide commercial **pBSK**. Un fragment contenant le site polyA du gène UL24 (GAATTCATCGATTAAATTAAGAT-ATCACTAGT) suivi d'un poly-linker contenant notamment un site PstI et un site EcoRV, a été synthétisé par PCR puis inséré par recombinaison homologue immédiatement en amont du site polyA du gène UL27, générant ainsi le plasmide de recombinaison pIGR20. La cassette de transcription hCMV GFP a été clonée dans le site PstI de pIGR20 (dans la région IGR20) pour obtenir le plasmide **pIGR20 GFP**, exprimant la GFP sous le contrôle de hCMV. Les cassettes d'expression de la luciférase sous le contrôle des différents promoteurs décrits plus haut, ont été extraits des plasmides d'expression pGI3 par digestion BglII et BamHI puis clonés dans le sens 3'-5' dans le site EcoRV du plasmide de recombinaison pIGR20. Ces plasmides s'intitulent **pIGR20 promoteur Luc** (ex : **pIGR20 AFP Luc**). Le promoteur Us3 a été synthétisé par PCR à partir de l'ADN viral Cgal+. Le fragment -200 à -1 a été obtenu avec le primer sens BglII 5'-TTAATCCAGATCTTAAAAATTTAAGGGCCCTACG-3' et le primer non sens HindIII 5'-TTAATCCAAGCTTTCGCCGCACCGTGAGTG-3'. Le fragment a été cloné dans pGI3 basic pour obtenir le plasmide d'expression **pGI3 promUs3**. Le gène Us3 a été synthétisé par PCR à partir de l'ADN viral du virus Cgal+ avec le primer sens EcoRV 5'-TTAATCCGATATCGGTGCGGCGAATGGCCTGTC-3' et le primer non sens Clal 5'-TTAATCCATCGATTCATTTCTGTTGAAACAGCGGC-3'. La séquence polyA endogène d'Us3 a été synthétisée par PCR depuis l'ADN viral Cgal+ avec le primer sens Clal 5'-TTAATCCATCGATAGAACAATAAAGGCGGTGGTATC-3' et le primer non sens XbaI 5'-TTAATCCTCTAGAGTATTTAACTGCACCCCGTCC-3'. Le gène luciférase a été retiré du plasmide pGI3 basic pour obtenir le plasmide de clonage **pGI3**. pGI3 basic a été digéré

par NcoI puis rendu « bouts francs » avant d'être de nouveau digéré par XbaI. Le plasmide pUs3 (ORF Us3 sans promoteur) a été obtenu par la ligation de ces 3 fragments. Le promoteur ANGPTL3 a été extrait du plasmide d'expression pGI3 ANGPTL3 par digestion NheI et HindIII. Le fragment Us3polyA a été extrait de pUs3 par HindIII et XbaI. Les deux fragments ont été clonés simultanément dans le site SpeI du polylinker de pIGR20 pour donner le plasmide de recombinaison **pIGR20 ANGPTL3 Us3**. Le promoteur 9xHRE a été synthétisé par PCR depuis le plasmide d'expression pGI3 9xHRE avec le primer sens SpeI 5'-TTAATCCACTAGTAACTTGTATTGCAGCTTATAATG-3' et le primer non sens HindIII 5'-TTAATCCAAGCTTAGCTTGACCACACTTCCCC-3' et cloné comme précédemment pour donner le plasmide de recombinaison **pIGR20 9xHRE Us3**. Tous les fragments synthétisés par PCR ont été séquencés pour s'assurer de la fidélité de la réaction de polymérisation. Les plasmides de recombinaison sont utilisés pour introduire les différentes cassettes d'expression dans le locus IGR20 d'HSV-1, par recombinaison homologue dans les cellules VERO ou VERO7b, tel qu'il sera décrit plus bas.

## 5. Extraction d'ADN viral

Environ  $1.10^7$  cellules VERO cultivées à confluence sont infectées à m.o.i. 1. Les cellules sont récoltées à 24hpi, culotées puis lysées sur la nuit à 37°C dans 1 ml d'EDTA 10mM, Tris 10mM pH8, SDS 20% (0,6% final), Protéinase K 0,25 mg/ml. L'ADN est extrait par addition d'1 ml de phénol chloroforme. Après homogénéisation et centrifugation 10 minutes à 3000 rpm et 4°C, le surnageant contenant l'ADN est récupéré avec l'interface blanchâtre phénol/eau, puis l'ADN est extrait dans les mêmes conditions. Le surnageant et l'interface blanchâtre sont ajoutés à 1 ml de Chloroforme alcool isoamilic. Après 10 mn de centrifugation (3000rpm, 4°C), le surnageant et l'interface sont extraits par 10ml d'éthanol 100% à -20°C. L'ADN, sous forme d'une pellette en suspension, est prélevée avec une pipette pasteur. Après évaporation de l'alcool résiduel autour de la pellette, l'ADN est resuspendu dans de l'eau ultra pure sans agitation à +4°C jusqu'à resuspension (min 24 heures).

## 6. Construction des virus recombinants Cgal+ IGR20 prom Luc, D30EBA IGR20 prom Luc, 17+ ANGPTL3 Us3 et 17+ 9xHRE Us3

**Etape 1 :** Pour construire les virus exprimant Luc ou Us3 sous contrôle des différents promoteurs clonés dans la région IGR20 du génome viral, deux étapes successives sont nécessaires. Dans un premier temps, le gène hCMV GFP est introduit dans cette région par recombinaison homologue. Le virus recombinant correspondant est reconnaissable par des plages de lyse vertes qui permettent son identification, son isolement, et sa production. Ensuite, les différentes cassettes d'expression prom Luc ou prom Us3 sont introduites à la place de hCMV GFP, également par recombinaison homologue, générant ainsi des virus recombinants dont les plages de lyse incolores nous permettent en principe de les identifier et de les isoler.

Je ne décrirai ici que les constructions utilisant le virus Cgal+, toutes les autres étant identiques. Quelques  $\mu\text{L}$  de la suspension d'ADN du virus Cgal+ sont mélangés avec une suspension d'1  $\mu\text{g}$  d'ADN du plasmide de recombinaison pIGR20 GFP et ajoutés à 500 $\mu\text{L}$  de HBS (Hepes buffer saline) et 30 $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  2M. Après oxygénation, la suspension de transfection est versée sur un tapis de cellules VERO confluentes à environ 60% et rincées préalablement 2 à 3 fois avec du HBS. Les cellules sont placées

10 minutes à 37° puis sont recouvertes de 2ml de DMEM est laissées 4 à 6 heures maximum à 37°C. Le milieu est retiré et les cellules sont recouvertes d'un milieu à 15% de glycérol pendant 2 minutes à 37°C. Les cellules sont lavées 3-4 fois avec du HBS et recouvertes de DMEM. Les cellules ainsi transfectées avec de l'ADN viral sont récoltées par grattage dès l'apparition des premières plages de lyse. La suspension cellulaire contenant les virus recombinants subit 3 cycles de congélation-décongélation puis est utilisée pour infecter des cellules VERO en suspension et ensuite « platées » en plaque 96 puits. Après développement de l'infection, la présence de plages de lyse vertes correspondant à l'expression de la GFP est détectée au microscope à fluorescence. Les plages de lyse vertes correspondent à la propagation d'un virus ayant intégré la cassette d'expression hCMV GFP. Les plages vertes sont récoltées dans 100µL de milieu et aliquotée est divisé en 2 x 50µL : un échantillon est placé à -20°C et l'autre échantillon est dilué une fois dans du tampon de lyse contenant du Tris HCl 10mM pH8, KCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5mM, Tween 20 0,45% et protéinase K 60 µg/ml. Après une heure d'incubation à 60°C, 2µL sont utilisés pour réaliser une PCR pour vérifier la présence de la séquence GFP. L'autre échantillon est utilisé à des dilutions croissantes (dilution limite) pour infecter des cellules VERO en plaques 96 puits de telle sorte que puisse être détectée une seule plage par puits. Après trois étapes de dilution limite permettant d'isoler et de caractériser, au microscope et par PCR, une seule plage de lyse par puits, le virus est amplifié jusqu'à produire le stock viral du virus **Cgal+ IGR20 GFP**.

**Etape 2 :** Construction des virus exprimant la luciférase. L'ADN du virus **Cgal+ IGR20 GFP** est extrait par phénol chloroforme puis digéré par PaeI. L'ADN digéré est de nouveau extrait puis cotransfecté comme précédemment avec 1 µg d'un plasmide de recombinaison exprimant la luciférase sous contrôle d'un promoteur particulier (ex : **pIGR20 9xHRE**). Cette opération est répétée pour chaque plasmide de recombinaison. Les virus donnant des pages de lyse qui ont perdu la couleur verte (au microscope à fluorescence) sont prélevés puis caractérisés par PCR pour confirmer la perte du gène GFP et l'acquisition du gène de la luciférase. Comme dans l'étape 1, ces virus recombinants sont purifiés en dilution limite et produits sur cellules VERO (ou VERO7b dans le cas des virus défectifs pour ICP4). L'ADN de chaque virus recombinant est ensuite extrait puis digéré par NotI ou BstBI afin de vérifier le profil de restriction de leur génome.

## 7. Construction du virus recombinant 17+ Us3-galK+ par la technique BAC

La technique de mutagenèse utilisée pour modifier le génome du virus HSV-1 17+ après clonage dans un chromosome artificiel de bactérie (BAC), afin de créer le virus 17+ Us3-, a été mise au point par Soren Warming (224) et son principe est expliqué en détail sur le site internet <http://recombineering.ncifcrf.gov/> (protocole n°3).

Les primers pour synthétiser la séquence galK sont choisis de telle sorte qu'ils éliminent l'ORF Us3 de l'ATG jusqu'au codon stop. Le primer sens 5'-CGGGGCCCGTCGTTTCGGGGTGCTCGTTGGTTGGCACTCACGGTGCGGCGACCTGTGACAATTAATCATCGGCA-3' code pour 50pb en amont de l'ATG de l'ORF Us3 et le primer non sens 5'-TCGGGGTCTTTTTGTGCCAACCCGCAAACAGCACCGCCCCCAGGGGGCGGTTCAGCACTGTCCTGCTCCTT code pour 50pb en aval du codon stop du gène Us3. Ils sont utilisés pour synthétiser le fragment de recombinaison contenant le gène galK et un promoteur minimum à partir du plasmide pgalK (224). Le produit de synthèse est électroporé dans

les bactéries SW102 contenant déjà le BAC HSV-1 17+. Après sélection sur milieu contenant uniquement du galactose comme source de carbone, les bactéries sont amplifiées en maxiculture dans du milieu LB à 31°C. La recombinaison a lieu spontanément dans ces bactéries, résultant dans l'introduction du gène galK à la place de l'ORF Us3. L'ADN HSV-1 17+ Us3- galK+ est extrait avec le Large-Construct kit de Qiagen selon le protocole du fournisseur. Cet ADN BAC est digéré par NotI ou BstBI puis déposé sur gel d'agarose 0,5%. Après migration, les profils de restriction du BAC parental et du BAC Us3-galK+ sont comparés pour vérifier la présence de la cassette contenant galK à la place de l'ORF Us3. Les plasmides BAC parentaux et recombinants sont ensuite transfectés dans des cellules TE-Cre-grina (241). L'enzyme de recombinaison spécifique de site Cre permet de sortir le plasmide BAC (qui est entouré par deux sites loxP) du génome HSV-1 (66). Les virions produits dans ces cellules sont purifiés selon la méthode de dilution limite expliquée ci-dessus et leur structure génétique est vérifiée par digestion enzymatique.

### **8. Tests $\beta$ -galactosidase/luciférase**

Les cellules testées pour l'activité  $\beta$ -galactosidase/luciférase sont lavées avec du PBS et récoltées selon les instructions du kit  $\beta$ -Galactosidase Enzyme assay system (Promega), à l'exception de l'étape de lyse où le tampon Reporter Lysis Buffer est remplacé par le tampon Glo Lysis Buffer (Promega). Pour arrêter la réaction enzymatique de la  $\beta$ -galactosidase, le carbonate de sodium 1M est remplacé par du Tris base 1M. L'activité luciférase est mesurée à l'aide du kit Steady-Glo Luciferase assay system (Promega) selon les instructions du fournisseur. L'activité luciférase et l'activité  $\beta$ -galactosidase sont mesurées sur un luminomètre VICTOR<sup>3</sup> de la firme Perkin Elmer.

### **9. Détermination de la cinétique d'activation des promoteurs à l'aide de l'acide phosphonoacétique (PAA).**

Les cellules sont incubées dans du milieu contenant de l'acide phosphonoacétique (PAA) à 100 $\mu$ M, 2 heures avant l'infection. Le PAA est un inhibiteur de l'ADN polymérase des virus herpétiques, en présence duquel le génome viral ne peut se répliquer. L'inoculation, ainsi que l'infection, jusqu'à l'arrêt de l'expérience, sont réalisées en présence d'un milieu contenant de PAA à 100 $\mu$ M.

### **10. Analyse des protéines par Western Blot**

Les cellules, à confluence dans un puits de plaque 6 puits, sont lavées 2 fois dans du PBS froid puis prélevées par grattage. Les cellules sont centrifugées et le culot est conservé à -80°C. Les cellules sont lysées dans 50  $\mu$ l de tampon contenant 20mM d'Hepes pH 7,4, 100mM NaCl, 0,2% triton, PMSF 1mM, DTT 2mM (dithiothreitol) et 50 $\mu$ l de PIC (Protease Inhibitor Cocktail), pendant 30 mn à 4°C. La suspension est centrifugée et les protéines sont dosées par la technique Bradford. 10 $\mu$ g de protéines dilués dans du tampon Laemmli sont chauffés à 100° pendant 5 minutes puis séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du SDS (sodium dodecyl sulfate) (PAGE) et sont ensuite transférés sur une membrane de polyvinylidène difluoride. Les membranes sont incubées pendant une demi heure, dans du PBS + 0,1% triton + 2,5% de lait écrémé en poudre. Elles sont ensuite incubées pendant 2 heures avec un anticorps de lapin anti-Us3 fourni gracieusement par Dr. Bernard Roizman (154), dilué

dans du PBS + 0,1% triton. Les protéines sont révélées par chemiluminescence (ECL de Amersham Biosciences).

### **11. Infection en condition d'hypoxie**

Les cellules sont platées 24 heures avant l'infection et incubées sur la nuit en normoxie pour leur permettre d'adhérer. Deux heures avant l'infection, les cellules sont placées dans un incubateur à hypoxie garantissant une atmosphère de 5% CO<sub>2</sub> et 1-1,1% d'O<sub>2</sub> à 37°C. Les cellules sont maintenues en hypoxie pendant toute la durée de l'expérience. Un contrôle négatif en condition de normoxie est systématiquement réalisé pour chaque expérience en hypoxie. La Déféroxamine (DFO) (sigma) est utilisée pour mimer les conditions d'hypoxie en stabilisant le facteur de transcription HIF1 $\alpha$ . Les cellules sont incubées en présence de DFO à 100 $\mu$ M de deux heures avant l'infection jusqu'à la fin de l'expérience.

### **12. Protocole expérimental in vivo**

Des souris athymiques nu/nu (Charles River Laboratories) âgées de 5-6 semaines reçoivent une injection sous cutanée en région latérale abdominale de 10<sup>7</sup> cellules Huh7. Les cellules croissent et les tumeurs deviennent vascularisées à partir de 4-5 semaines. Quand elles atteignent 200-500 mm<sup>3</sup>, les tumeurs sont injectées avec 50 $\mu$ l d'une suspension saline de virus. Pour l'administration intrahépatique, les animaux sont anesthésiés et ouverts chirurgicalement sur la ligne médiane de l'abdomen. Le foie est dégagé et les virus sont injectés directement dans le lobe gauche dans 50 $\mu$ l de suspension saline. Pour la détection in vivo de la luminescence, les animaux sont injectés en intrapéritonéal avec 3 mg de D-Luciférine Firefly (le substrat de la Firefly Luciferase) dans 100 $\mu$ l de PBS, anesthésiés et placés dans une chambre noire connectée à une caméra à photons. L'émission de photons est quantifiée 10 minutes après l'injection de luciférine et analysée avec le logiciel Living Image Software (Xenogen). Les animaux sont manipulés selon les protocoles validés par le comité d'éthique de l'Université de Pampluna (Espagne) où a été réalisée l'expérimentation animale.

### **13. Analyses statistiques**

Les écarts types sont calculés sur un triplicat de valeurs. Les différences entre moyenne de triplicat sont jugées significatives à l'aide du test de Student pour une valeur de P $\leq$ 0,05 (\*), P $\leq$ 0,01 (\*\*) ou P $\leq$ 0,005 (\*\*\*) .

# RESULTATS

Dans la première partie de mon travail de thèse j'ai caractérisé l'activité (spécificité, intensité et cinétique d'expression) d'un certain nombre de promoteurs de gènes potentiellement utilisables en virothérapie oncolytique. Ces promoteurs sont soit des promoteurs actifs spécifiquement dans les cellules de cancer, ou dans des cellules en prolifération active, déjà identifiés et testés dans d'autres systèmes, mais pas encore dans le contexte d'un virus HSV-1 oncolytique (promoteurs 9xHRE, E2F1, hTERT), soit des promoteurs spécifiques d'HCC que nous avons identifiés dans le cadre de notre programme de recherche. Dans ce premier chapitre je décrirai les modalités d'identification et d'analyse des promoteurs spécifiques d'HCC, ainsi que de leur validation lorsqu'ils sont exprimés dans le contexte d'un génome HSV-1.

## I. Identification de promoteurs à activité spécifique des HCC

### 1. Approche bioinformatique

Afin de définir un premier ensemble de promoteurs cellulaires particulièrement actifs dans les HCC, nous avons procédé à une recherche bibliographique des gènes surexprimés dans les HCC, indépendamment de tous critères étiologiques. Les gènes ainsi identifiés, ont été comparés à une liste de gènes naturellement exprimés dans le foie sain déjà publiés (193). Parmi ces gènes, 23 n'étaient pas ou très peu exprimés dans le foie sain (tableau 1) et furent proposés pour une étape supplémentaire de sélection avec le programme UniGene.

Le programme Unigene propose une vue détaillée du transcriptome humain et de ses liens avec la génomique et la protéomique. Ce programme a pour premier objectif de générer une banque de données (dbEST) contenant les séquences simple brin obtenues par le séquençage des cDNA générés dans différentes conditions (lignées cellulaires, tissu particulier...etc). Ces séquences sont appelées EST pour « Expressed Sequence Tags » et sont générés par de nombreux laboratoires à travers le monde. Les séquences, d'environ 400 à 600pb, possédant des homologies permettent de définir des clusters d'expression qui sont appelés UniGene clusters. Ce recoupement d'information a également été très utile pour découvrir de nouveaux gènes. Le nombre de transcripts, calculé pour chaque EST, est intégré au niveau du cluster d'expression afin d'évaluer un niveau moyen d'activité transcriptionnelle par gène identifié et par condition (tissu sain, tissu tumoral, stade de développement...). A cause de l'implémentation régulière de la base de données, le niveau d'expression peut varier au cours du temps. Ce niveau d'expression est donné en transcrits par million ( $TPM = \text{Nombre d'EST dans le cluster} / \text{Nombre total d'EST dans le tissu} \times 10^6$ ). Cette approximation permet d'utiliser UniGene comme un Northern blot virtuel des différents tissus humains. La spécificité d'expression d'un gène dans un tissu est calculée comme étant égal à :  $(TPM \text{ du gène dans le tissu}) / (\text{Somme des TPM du gène dans tous les tissus}) \times 100$ .

Le programme UniGene offre plusieurs outils permettant d'établir des liens entre, d'une part, les EST et d'autre part, les gènes, les protéines, les différents tissus et les différents types de tumeurs. Dans le projet THOVLEN, nous avons utilisé l'outil DDD (Digital Differential Display), qui compare les profils d'expression entre les différentes librairies. Une librairie correspond, par exemple, à un tissu au stade embryonnaire pour lequel tous les EST connus sont assemblées en cluster d'expression. Les clusters sont

référéncés à un gène et sont classés selon l'importance de leur expression mesurée en TPM.

<b>glycogen synthase 2</b>	<b>GYS2</b>
<b>Serpin peptidase inhibitor, clade A, member 7</b>	<b>SERPINA7</b>
<b>angiopoietin-like 3</b>	<b>ANGPTL3</b>
<b>Inter-alpha (globulin) inhibitor H1</b>	<b>ITIH1</b>
<b>Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 8</b>	<b>CYP2C8</b>
<b>inter-alpha (globulin) inhibitor H2</b>	<b>ITIH2</b>
<b>Alcohol dehydrogenase 6 (class V)</b>	<b>ADH6</b>
<b>Apolipoprotein A-I</b>	<b>APOA1</b>
<b>alpha fetoprotein</b>	<b>AFP</b>
<b>Serine dehydratase</b>	<b>SDS</b>
<b>Apolipoprotein B (including Ag(x) antigen)</b>	<b>APOB</b>
<b>Fibrinogen beta chain</b>	<b>FGB</b>
<b>Inter-alpha (globulin) inhibitor H3</b>	<b>ITIH3</b>
<b>Inter-alpha (globulin) inhibitor H4</b>	<b>ITIH4</b>
<b>Vitronectin</b>	<b>VTN</b>
<b>Albumin</b>	<b>ALB</b>
<b>Serpin peptidase inhibitor, clade A, member 1</b>	<b>SERPINA1</b>
<b>Coagulation factor II (thrombin)</b>	<b>F2</b>

**Tableau 1 : Liste des 23 gènes à spécificité d'expression élevée dans les HCC, sélectionnés à partir de notre recherche bibliographique.**

Pour nous servir de cette DDD, nous avons établi un ensemble de critères supposés définir le mieux les promoteurs spécifiquement actifs dans les HCC. Ainsi, les 23 gènes initiaux ont été classés selon leur niveau d'expression dans 3 classements intermédiaires qui apportent des informations différentes :

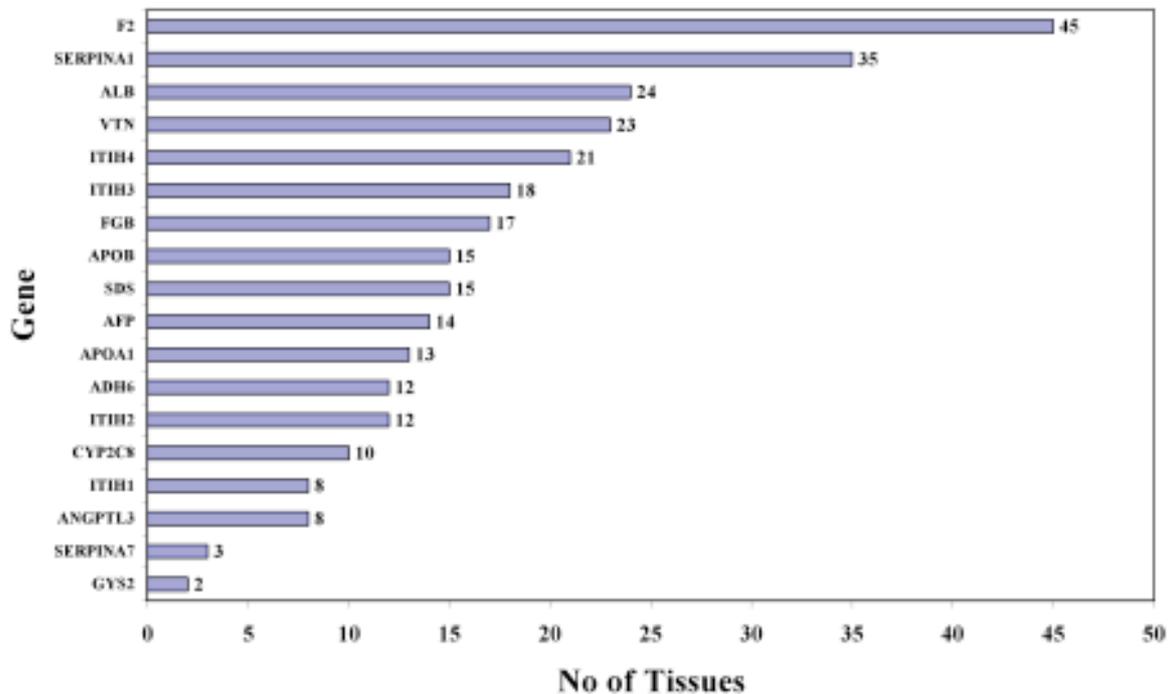
1) Ces gènes sont comparés entre les bases de données de tous les tissus pour rechercher une spécificité pour le tissu hépatique (figure 1)

2) On recherche également une expression augmentée dans les tissus embryonnaires qui partagent des similarités avec les tissus tumoraux et qui soit faible dans les tissus adultes (figure 2).

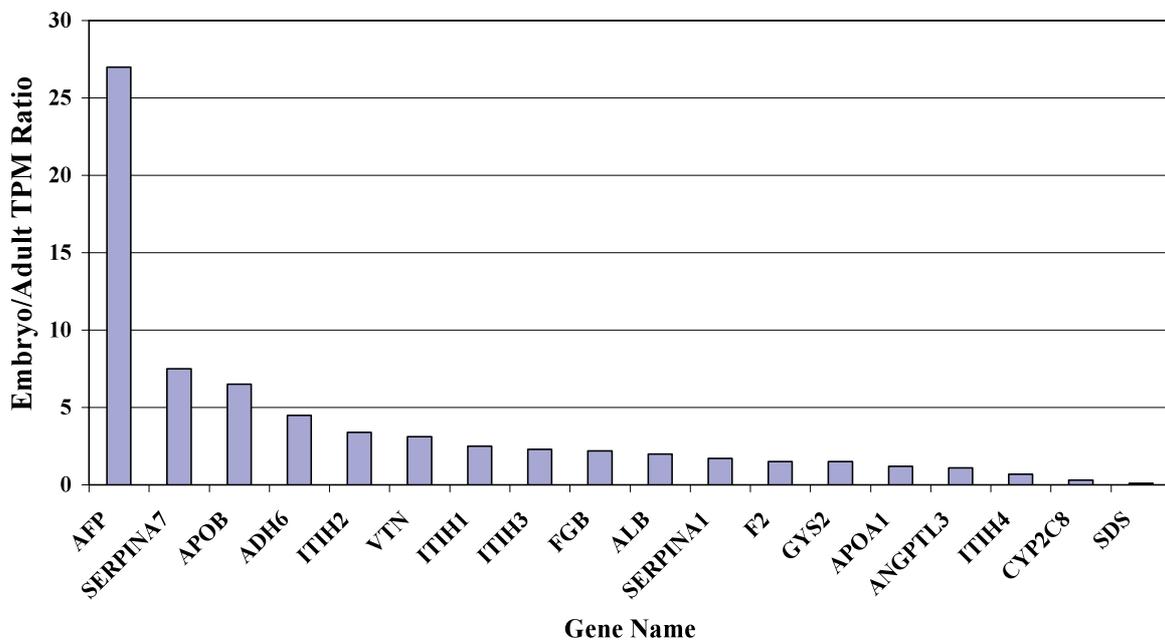
3) Les gènes sont classés selon leur spécificité pour un type de tumeur (figure 3).

Ces trois paramètres permettent de cerner la notion de spécificité tissulaire et tumorale des promoteurs. Le rapport « expression dans les tumeurs du foie / expression dans les

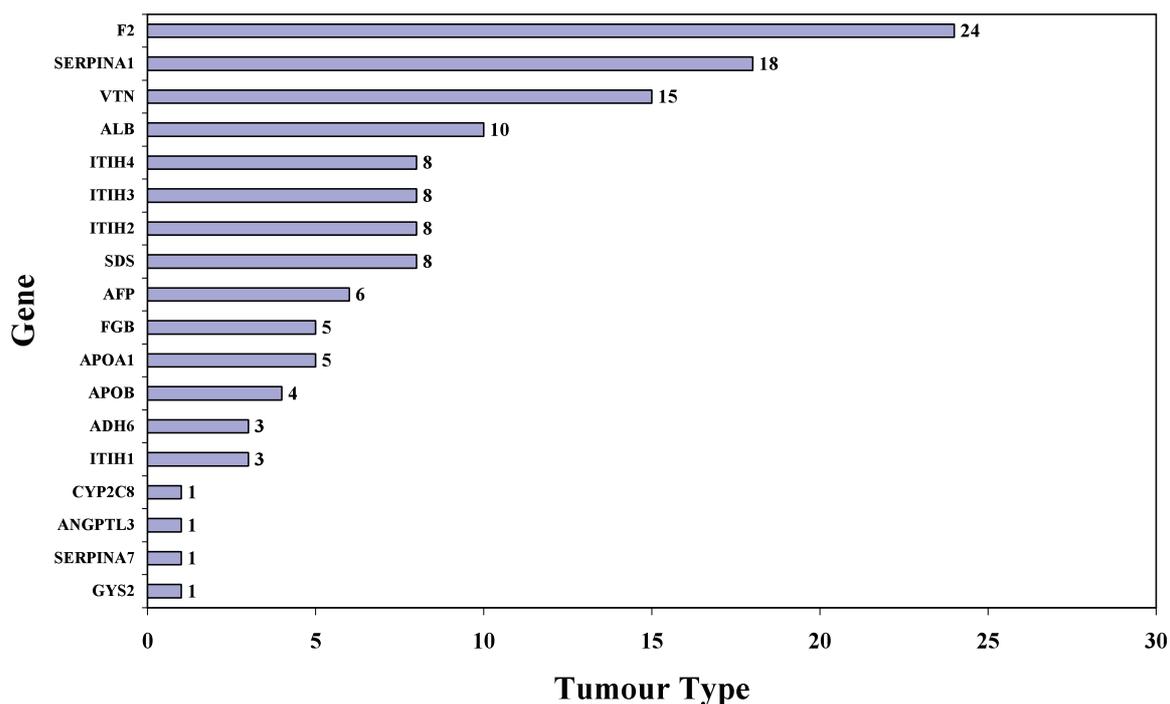
tissus sains » qui exprime l'activité différentielle, est choisi pour un classement final théorique (tableau 2).



**Figure 1 :** Les gènes sélectionnés (voir tableau 1) sont comparés selon le nombre de tissus dans lesquels ils sont transcrits. Par exemple, selon UniGene, le gène de la glycogène synthase 2 (GYS2) est exprimé dans 2 tissus selon UniGene : le foie et le rein. Le gène de l'ANGPTL3 est exprimé dans 8 tissus différents dont le foie.



**Figure 2 :** Les gènes issus sélectionnés (voir tableau 1) sont classés selon leur rapport d'expression entre tissus embryonnaires et tissus adultes. Ainsi, le gène AFP montre un taux d'expression dans l'embryon au moins 25 fois supérieur à celui de l'adulte.



**Figure 3 :** Les gènes sélectionnés (voir tableau 1) sont classés selon le nombre de tumeurs dans lesquelles ils sont exprimés. Par exemple, les gènes GYS2 et ANGPTL3 ont une spécificité d'expression tumorale puisqu'ils ne sont exprimés que dans les tumeurs du foie.

Gène	TPM tumeurs du foie	TPM tissus normaux	Ratio
ApoB	1913	73	26,2
ITIH3	444	29	15,3
CYP2C8	589	40	14,7
ITIH1	393	45	8,7
AFP	1334	209	6,4
FGB	1437	287	5,0
ANGPTL3	144	28	5,1
ADH6	134	29	4,6
SERPINA1	2265	530	4,3
VTN	403	111	3,6
E2F1	41	8	5,1
VEGFA	237	50	4,7

**Tableau 2 : Rapport de l'expression dans les tumeurs du foie et dans les tissus sains.** Les 10 gènes issus de la sélection dont la séquence promotrice est connue. Les promoteurs AFP et SERPINA1 ( $\alpha$ 1-antitrypsine) sont déjà utilisés en virothérapie oncolytique. Les promoteurs E2F1 et VEGFA ont été ajoutés à titre indicatif car E2F1 sera utilisé dans cette étude et le promoteur VEGFA contient des site de fixation HRE qui seront également étudiés dans ce travail de recherche.

Peu de gènes sont à la fois spécifiques des tumeurs du foie et possèdent une activité différentielle importante entre tissus tumoraux et tissus sains. Ainsi, le gène de la Glycogène Synthase 2 serait, d'après nos résultats, le gène idéal dans la mesure où il s'exprime dans les tumeurs du foie et quasiment dans aucun autre tissu, y compris dans les tissus embryonnaires. Sa spécificité hépatique atteint quasiment 95% et sa spécificité tumorale de 96% est identique à sa spécificité pour les tumeurs hépatiques. Son ratio d'expression tumeur/ tissus sains est de 28. Mais malheureusement, la séquence de ce promoteur n'est pas connue. Ensuite tous les autres promoteurs sont moins spécifiques car s'exprimant dans d'autres tissus et dans d'autres tumeurs. Le promoteur ANGPTL3 montre une activation de son expression spécifiquement dans les cancers du foie. Néanmoins, il possède une activité basale, selon UniGene, dans quelques tissus sains tel que le rein ou le système nerveux.

L'activité différentielle des promoteurs est un rapport de TPM fournis par UniGene et n'intègre nullement la notion de spécificité. Dans le cadre de la virothérapie oncolytique, l'hypothèse justifiant le calcul du rapport d'activité est qu'il existe une relation entre la quantité de protéine virale et l'efficacité de la fonction virale portée par cette protéine. Ce point sera débattu plus loin dans ce travail de recherche et la différence d'activité promotrice sera mise en évidence grâce à l'expression de la luciférase (qui est le gène rapporteur utilisé ici pour déterminer la force du promoteur cloné en amont), ce qui permettra d'établir également d'autres critères définissant l'activité d'un promoteur. Le promoteur du gène codant l'AFP peut être considéré comme un point de repère théorique dans la mesure où il est considéré comme un marqueur des HCC. Il est représenté dans les figures 1, 2 et 3 et son activité différentielle est un facteur de 6,38.

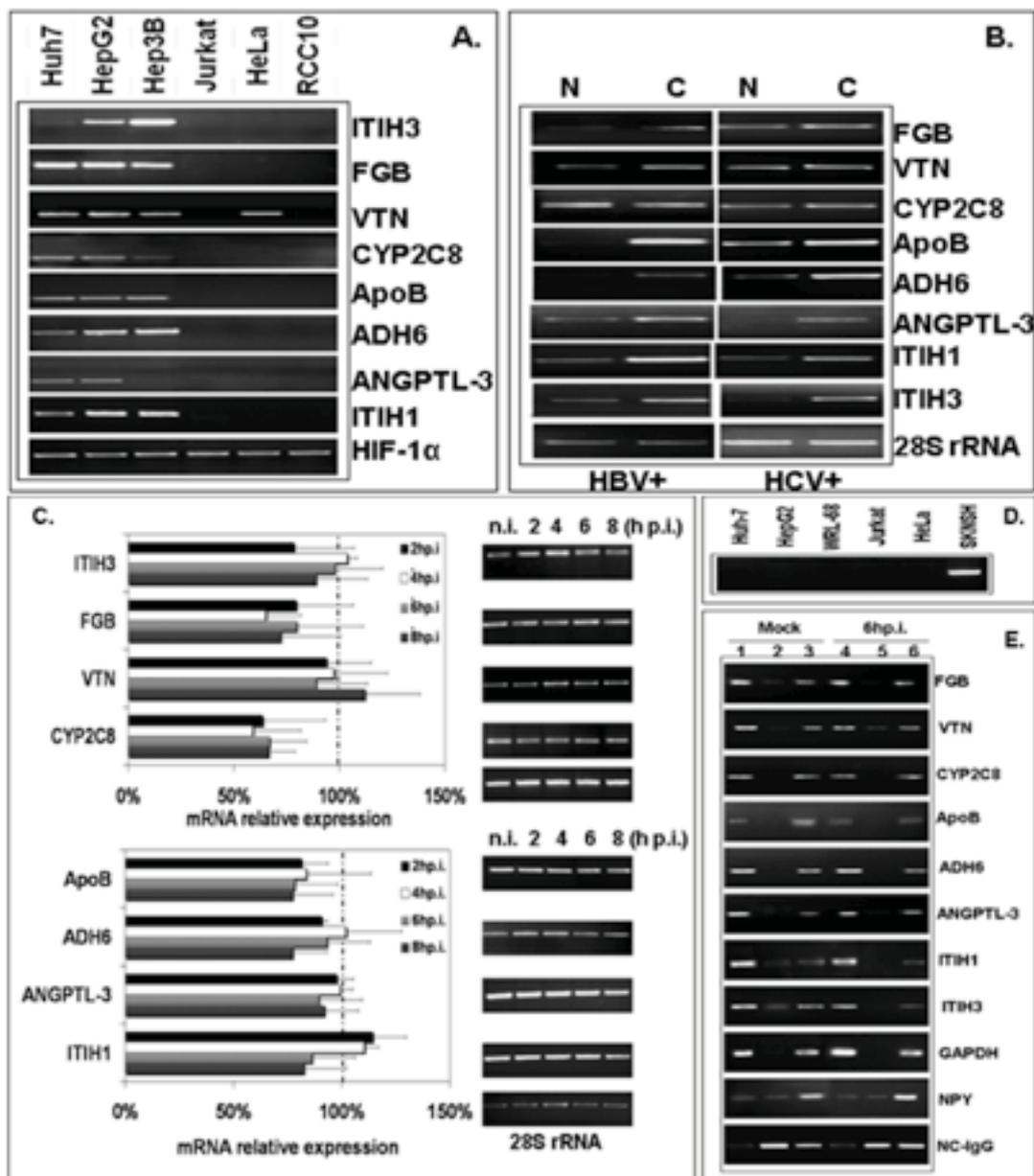
La spécificité d'activité de ces promoteurs a été vérifiée, par RT-qPCR et par analyse ChIP (Chromatine Immunoprecipitation), sur différentes lignées cellulaires qui nous servent de modèle pour les HCC, sur des prélèvements cliniques de tumeur du foie, sur des lignées tumorales non hépatiques (HeLa, Jurkat), sur une lignée hepatocyte-like (WRL68) et sur des hépatocytes primaires humains. Ces résultats sont repris en détail dans la figure 2 de l'article 1 (voir ci dessous).

## 2. Analyse de la transcription par RT-PCR

Ce paragraphe peut être isolé en tant que partie de l'article 1 réalisée par le Docteur Peli Foka (Co auteur de l'article 1 en annexe). Je fournirai ici les principaux résultats relatifs à son étude par RT-PCR. Le reste de l'article en annexe, concernant directement mon étude des promoteurs cellulaires dans le génome HSV-1, sera intégré à la suite de cet exposé.

Après avoir établi grâce au logiciel UniGene, une liste de gènes possédant une expression différentielle entre cellules d'hépatome et cellules saines, ainsi qu'une relative spécificité pour ces tumeurs, nous avons vérifié la présence des transcrits correspondants dans différents échantillons biologiques pour 8 de ces gènes dont les séquences des promoteurs étaient connues. Les expériences de RT-qPCR ont été réalisées à partir d'ARN des lignées d'HCC (Huh7, HepG2, Hep3B), de cellules Jurkat, HeLa et RCC10 (article 1 figure 2A) ainsi que de cellules saines et cancéreuses issus de patients séropositif pour le virus HCV ou le virus HBV et de patients séronégatifs pour ces deux virus (article 1 figure 2B). Pour anticiper sur l'activité des promoteurs cellulaires lorsqu'ils seront clonés dans le génome HSV-1, nous avons comparé la quantité des ARNm des gènes d'intérêt à différentes heures post infection par HSV-1 (article 1 figure 2C). Les résultats montrent que les cellules Huh7 possèdent la même quantité d'ARNm pour chacun de ces gènes avant et après infection par HSV-1. Afin de s'assurer que l'activité transcriptionnelle n'était pas affectée par l'infection, une expérience de CHIP a été réalisée à partir de cellules Huh7 non infectées et 6 heures après infection avec le virus HSV-1 Cgal+ (article 1 figure 2E). Les résultats des analyses semi-quantitatives, suggèrent que l'infection ne fait pas varier l'activité des promoteurs. D'après ces résultats, les promoteurs ADH6, ApoB, et ANGPTL3 ont été clonés dans les plasmides pGI3 basic en amont du gène de la luciférase, dont la mesure de l'activité permettra de déterminer la force du promoteur après transfection des plasmides recombinants dans les 3 lignées d'HCC et dans la lignée hepatocyte-like WRL68 (article 1 figure 3A). Nous avons vérifié que la surinfection avec un virus HSV-1 Cgal+ des cellules transfectées, n'entraîne pas de changement significatif de l'activité transcriptionnelle. L'activation des promoteurs valide également la séquence régulatrice qui a été choisie pour chacun d'entre-eux. Dans l'article 1, seule la cassette ANGPTL3 a été évaluée pour son activité transcriptionnelle après insertion dans la région IGR20 du génome HSV-1 Cgal+. Je reprendrai cette étude dans le paragraphe 4 avec l'ensemble des promoteurs testés dans le projet THOVLEN.

Les résultats de RT-PCR semi quantitative (article 1 figure 2A et B) réalisées à partir des ARN des lignées cellulaires confirment donc les résultats obtenus avec le logiciel UniGene quant à la spécificité des promoteurs dans les tumeurs du foie, à l'exception de VTN qui est aussi exprimé dans les cellules HeLa. Le gène ANGPTL3 possède une spécificité restreinte à deux des trois hépatomes et ne s'exprime pas dans la lignée Hep3B. Les résultats de RT-PCR semi quantitative réalisées à partir d'ADN de biopsies de patients (article 1 figure 2B), montrent que les gènes surexprimés dans les HCC sont ApoB, ADH6, ANGPTL3, ITIH1 et ITIH3 avec une spécificité pour ANGPTL3 qui apparaît comme le seul promoteur non exprimé dans le foie chez un patient souffrant d'une infection hépatique par le virus HCV.



**Article 1 figure 2 : Les gènes candidats sont spécifiquement exprimés dans le foie et ne sont pas inhibés par l'infection par HSV-1. Profils d'expression des ARNm. A :** dans les lignées cellulaires modèles de HCC et d'autres types cancéreux. Hypoxia inducible factor 1-alpha (HIF-1 $\alpha$ ) est utilisé comme contrôle interne de PCR. **B :** dans des prélèvements tumoraux (C) et non tumoraux (N) de patients atteints d'HCC lié à HBV (HBV +) ou d'HCC lié à HCV (HCV+). L'ARN 28S est utilisé comme contrôle interne de PCR. **C :** infection de cellules d'HCC Huh7 par HSV-1 wt. La ligne interrompue représente le contrôle non infecté. Toutes les valeurs sont normalisées par rapport à l'ARN 28S. Les tests ANOVA I et de Student entre échantillons montrent que les différences entre échantillons ne sont pas significatives ( $p > 0.05$ ). **D :** Expression de l'ARN NPY dans les différentes lignées cellulaires. **E :** Expérience de ChIP à partir de cellules HCC Huh7 non infectées ou infectées 6h par HSV-1 wt. Les bandes 1 et 4 représentent de l'ADN enrichi en polymérase II. Bandes 2 et 5 représentent de l'ADN non spécifique enrichi en IgG et les bandes 3 et 6 de l'ADN contrôle de chaque gène (contrôle PCR). GAPDH et les primers contrôles négatifs sont utilisés comme contrôles positifs et négatifs selon les recommandations du fabricant.

Les valeurs des tests luciférase après transfection représentent ici un pourcentage de l'activité maximale du promoteur dans une lignée. Pour les 3 promoteurs clonés en amont de la luciférase (ADH6, ApoB et ANGPTL3), la lignée HepG2 est celle qui permet la plus forte expression. Le promoteur ADH6 ne semble pas s'exprimer dans les cellules Huh7, au contraire d'ANGPTL3 qui est activé dans ces cellules presque autant que dans les cellules HepG2.

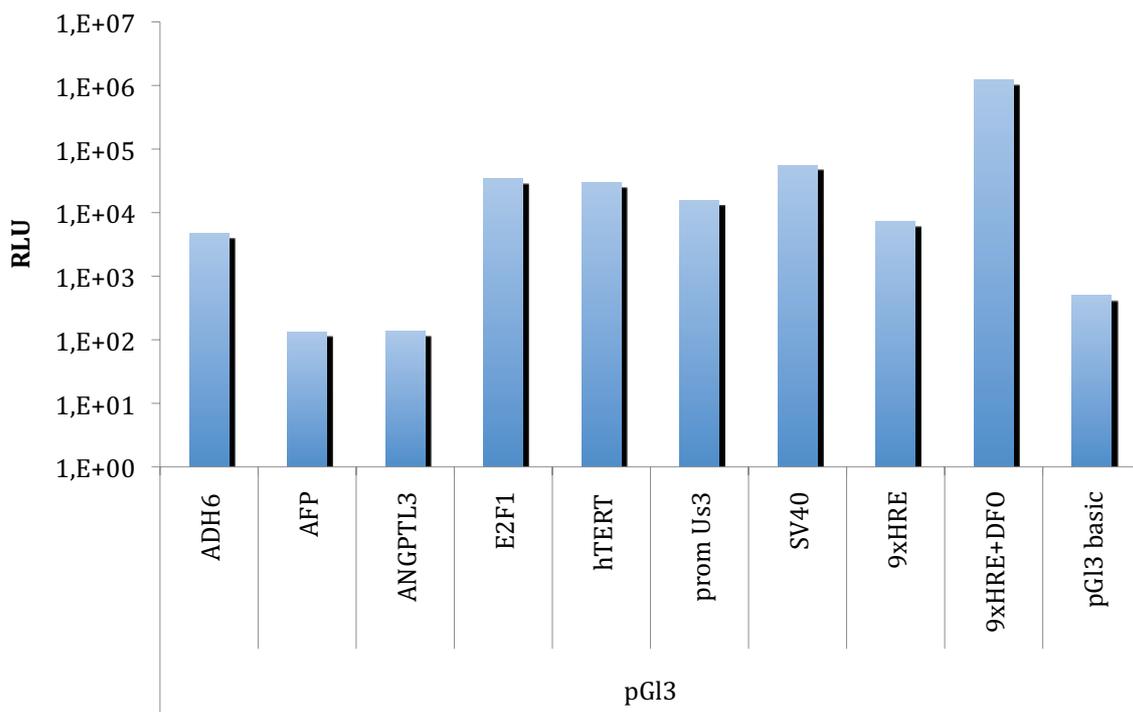
Les résultats présentés dans l'article 1 ont donc permis de sélectionner les promoteurs ANGPTL3, ADH6 et ApoB pour la suite du projet THOVLEN sur la base de leur activité différentielle dans les HCC. Mon travail concerne la caractérisation du comportement d'un ensemble de promoteurs (d'HCC ou d'autres tumeurs) lorsque ceux-ci sont clonés dans un génome HSV-1. Certains de ces promoteurs ont été ensuite utilisés pour construire deux virus oncolytiques. L'étude des courbes de croissance de ces virus oncolytiques, ainsi que l'activité de ces promoteurs estimés par des tests à partir de virus où ces promoteurs contrôlent l'activité luciférase, permettront d'établir des pistes de recherche pour rationaliser les bases du ciblage transcriptionnel en virothérapie HSV-1 oncolytique.

## II. Méthodologie pour l'étude des promoteurs de ciblage

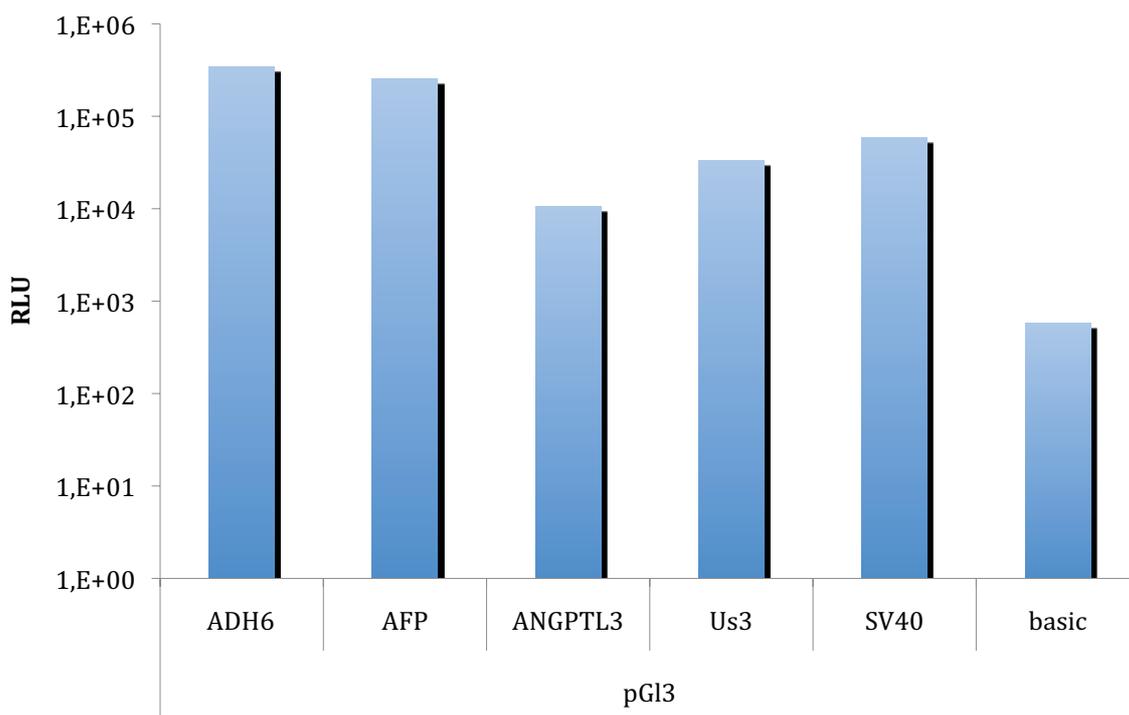
### 1. Analyse des promoteurs par l'activité luciférase dans les plasmides pGl3 et pIGR20

Plusieurs séquences promotrices de gènes ont été étudiées ; leur séquence a été donnée dans Matériels et Méthodes. Les séquences promotrices que nous utilisons et que j'appellerai par la suite « promoteur », sont en fait, les séquences promotrices connues ou en tout cas proposées comme étant promotrice, des gènes sélectionnés dans notre étude. Dans ce manuscrit, j'utiliserai leur abréviations à savoir : hCMV, ADH6, AFP, ANGPTL3, E2F1, hTERT et 9xHRE. Le promoteur du gène viral Us3 a été aussi inclus dans cette étude. Son abréviation est promUs3.

Les plasmides d'expression exprimant la luciférase sous contrôle de ces différents promoteurs ont été transfectés dans les lignées HeLa et HepG2 pour valider les constructions génétiques et tester une première fois, à titre indicatif, la spécificité des promoteurs en fonction des types cellulaires.



**Figure 4 : Comparaison des promoteurs sélectionnés dans les cellules HeLa.**  $3.10^5$  cellules HeLa sont transfectées avec  $3\mu\text{G}$  de plasmides pGl3 promoteur + luciférase. Les résultats, obtenus 48 heures post transfection (hpt), sont normalisés par rapport à l'activité de la luciférase de renilla (phCMV rLuc), utilisée comme contrôle interne de transfection. Après normalisation, les résultats sont présentés en unités relatives de luciférase (RLU). Le plasmide pGl3 basic qui possède le gène de la luciférase de luciole sans promoteur est utilisé comme témoin négatif d'expression luciférase. Le plasmide SV40 Luc est un plasmide témoin positif fourni par Promega contenant le promoteur SV40.



**Figure 5 : Comparaison des promoteurs dans les cellules HepG2.**  $3.10^5$  cellules HepG2 sont transfectées avec  $3\mu\text{G}$  de plasmides pGl3 contenant les promoteurs indiquée. Les résultats, obtenus 48 heures post transfection (hpt), sont normalisés par rapport à l'activité de la luciférase de renilla (pHCMV rL), utilisée comme témoin interne de transfection. Après normalisation, les résultats sont présentés en unités relatives de luciférase (RLU). Les contrôles sont les mêmes que dans la figure 4.

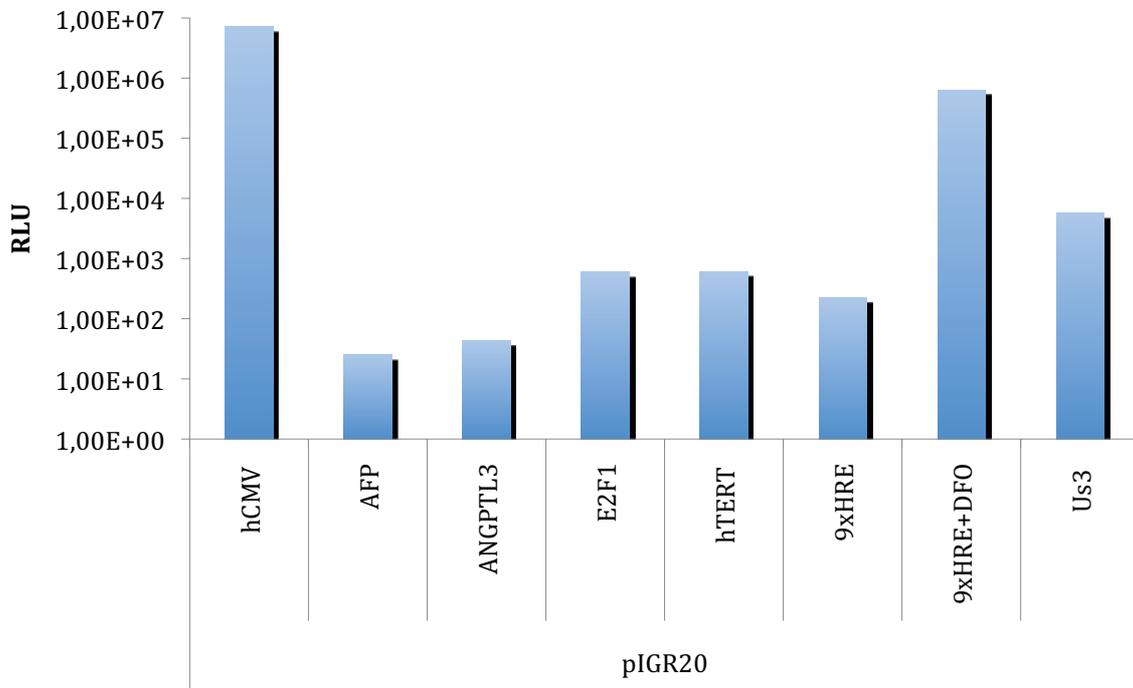
Pour ceci,  $3.10^5$  cellules HeLa sont transfectées avec  $3\mu\text{g}$  de ces plasmides, exprimant la luciférase de luciole et  $2\mu\text{g}$  de plasmides exprimant la luciférase de renilla, comme contrôle interne de transfection. Les valeurs finales dans les graphiques 4 à 6 sont normalisées par rapport à l'activité de la luciférase de renilla. Les cellules sont récoltées à 48 heures post-transfection (hpt) (figure 4). Les promoteurs AFP et ANGPTL3 ne montrent aucune activité dans les cellules HeLa (émission de photons inférieure à pGl3 basic) contrairement aux autres promoteurs, y compris le promoteur ADH6 sensé également avoir une spécificité d'expression dans les HCC. En présence de DFO (agent mimant l'hypoxie), le promoteur 9xHRE est activé d'un facteur 100.

L'activité des promoteurs ADH6, AFP et ANGPTL3 dans pGl3 a été ensuite évaluée dans la lignée cellulaire HepG2 (figure 5) dans les mêmes conditions que précédemment.

La spécificité d'expression des promoteurs AFP et ANGPTL3 dans les hépatomes est donc confirmée pour les cellules HepG2, dans la mesure où ces promoteurs ne s'expriment pas dans les cellules HeLa et s'expriment dans HepG2.

Figure 6, certains promoteurs ont été étudiés aussi dans le contexte des plasmides de recombinaison dans l'IGR20 d'HSV-1. La spécificité des promoteurs ANGPTL3 et AFP est

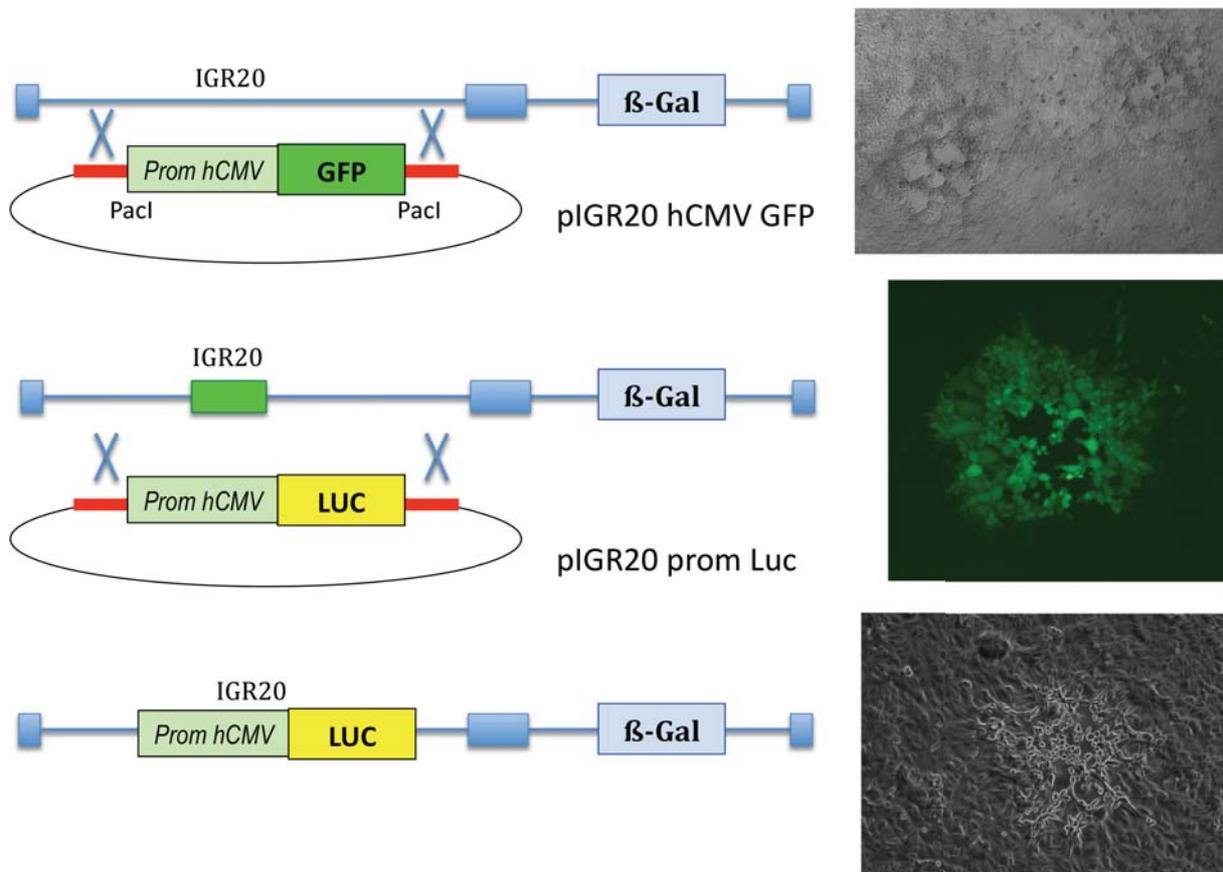
confirmée dans cet environnement génétique. Le promoteur Us3 conserve, dans les cellules HeLa, une activité semblable à l'activité dans les cellules HepG2. Ainsi, les promoteurs ANGPTL3 et AFP sont les seuls à s'exprimer spécifiquement dans les cellules HepG2.



**Figure 6 : Comparaison des promoteurs après clonage dans le plasmide de recombinaison pIGR20.**  $3.10^5$  cellules HeLa sont transfectées avec  $3\mu\text{G}$  de plasmides pIGR20 promoteur + luciférase. Les résultats, obtenus 48 heures post transfection (hpt), sont normalisés par rapport à l'activité de la luciférase de renilla (phCMV rL), utilisée comme témoin interne de transfection. Après normalisation, les résultats sont présentés en unités relatives de luciférase (RLU).

## 2. Construction des virus recombinants Cgal+ IGR20 promoteur Luc

Les virus HSV-1 recombinants exprimant la luciférase ont été construits par recombinaison homologue au niveau de séquences de 400pb de part et d'autre de la région intergénique 20 (située entre les gènes UL26 et UL27). La figure 7 présente les deux étapes de la construction de ces virus, qui sont nécessaires car l'introduction directe d'une séquence prom-Luc ne donne pas de phénotype facile à identifier.



**Figure 7 : Schéma de la construction en deux étapes des virus recombinants.** Une première étape, de sélection positive à la GFP sous le contrôle du promoteur hCMV, permet d'obtenir un virus recombinant modifié dans l'IGR20 qui se propage en donnant des plaques de lyse vertes. Ce virus est isolé, puis amplifié, et son ADN est extrait. Cet ADN est digéré par l'enzyme de restriction *PacI* puis cotransfecté avec le plasmide de recombinaison contenant la cassette promoteur-luciférase (ici promoteur hCMV Luc). La cassette vient s'insérer à la place de la GFP qui est éliminée et les virus recombinants se propagent dans des plaques de lyse blanches.

J'ai, de cette manière, construit et produit près de 20 virus recombinants (tableau 3). Les cassettes prom+Luc ont été clonées d'abord dans la souche répliquative HSV-1 Cgal+, qui contient le gène  $\beta$ -gal dans la région IGR52. Pour étudier la dépendance des promoteurs vis à vis des mécanismes d'activation de la transcription spécifiques du virus HSV-1, les mêmes cassettes ont été clonées aussi dans le locus IGR20 du génome de la souche non répliquative D30EBA. Cette souche est privée des deux copies du gène codant la protéine

essentielle ICP4, qui active l'expression des gènes  $\beta$ . Ces virus ne peuvent donc se multiplier que dans une lignée cellulaire exprimant la protéine ICP4 (cellules VERO 7B). Après infection de cellules non complémentantes, seuls les gènes  $\alpha$  s'expriment, à l'exception du gène ICP4. L'absence de ce gène bloque l'expression des gènes  $\beta$  provoquant l'arrêt du cycle de réplication en phase très précoce.

<b>IGR20</b>	<b>Souche répliquative HSV-1 Cgal+</b>	<b>Souche non répliquative HSV-1 D30EBA</b>
<b>Sans promoteur</b>	+	+
<b>hCMV GFP</b>	+	+
<b>hCMV</b>	+	+
<b>ADH6</b>	+	+
<b>AFP</b>	+	+
<b>ANGPTL3</b>	+	+
<b>E2F1</b>	+	+
<b>hTERT</b>	+	+
<b>9xHRE</b>	+	+
<b>promUs3</b>	+	

**Tableau 3 : Virus recombinants produits pour l'étude des promoteurs de gènes cellulaires.**

Après identification, purification, et production, les virus recombinants ont été caractérisés par le profil de restriction de leur génome. Ensuite leur viabilité et capacité de multiplication ont été estimées par l'établissement de courbes de croissances, qui montrent la capacité d'un virus recombinant à se propager dans des cellules en culture infectées à faible multiplicité. Les stocks de virus recombinants sont produits en infectant à m.o.i. 0,02 les cellules VERO à confluence contenues dans deux « Roller bottles » de 850 cm<sup>2</sup>. En moyenne la production de virions dans ces conditions permet d'obtenir 500 $\mu$ L de suspension virale à environ 5.10<sup>8</sup> pfu/ml.

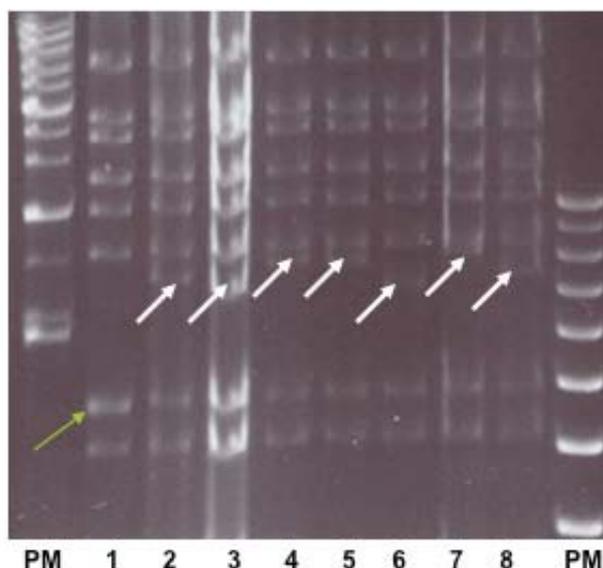
### 3. Structure des génomes recombinants

La structure des génomes a été vérifiée par digestion avec des enzymes de restriction. Après recombinaison avec les cassettes d'expression prom-luciférase, la taille du fragment contenant la région IGR20 est augmentée de manière différente, en fonction de la taille des séquences promotrices insérées (figure 8).

Le même type d'analyse a été réalisé pour valider la structure des génome des virus recombinants D30EBA IGR20 prom+luc.

Dans la suite de ma thèse, les virus recombinants exprimant le gène de la luciférase dans l'IGR20 sous le contrôle de différents promoteurs seront indiqués « Cgal+ prom Luc » (par exemple Cgal+ AFP Luc).

Colonne 1: génome parental HSV-1 Cgal+  
Colonne 2: Cgal+ IGR20 hCMV-Luc.  
Colonne 3: Cgal+ IGR20 ADH6-Luc  
Colonne 4: Cgal+ IGR20 AFP-Luc.  
Colonne 5: Cgal+ IGR20 ANGPTL3-Luc.  
Colonne 6 : Cgal+ IGR20 E2F1-Luc.  
Colonne 7 : Cgal+ IGR20 HTERT-Luc.  
Colonne 8 : Cgal+ IGR20 9xHRE-Luc.

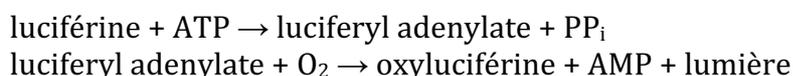


**Figure 8 : Profils de restriction des ADN des virus recombinants HSV-1 Cgal+ IGR20 prom+Luc.** Les ADN viraux sont digérés par l'enzyme NotI puis séparés par électrophorèse en gel d'agarose 1%. La flèche verte indique le fragment contenant l'IGR20 dans le génome parental. Les flèches blanches indiquent les fragments contenant l'IGR20 prom+Luc.

#### 4. Tests luciférase et $\beta$ -galactosidase. Normalisations

Pour étudier la force des promoteurs, nous utilisons le gène de la luciférase de Luciole (Firefly Luciferase) comme gène rapporteur. Cette protéine est un enzyme de 61kDa qui catalyse une réaction très rapide, de l'ordre de 15 à 300 msec en deux étapes.

Les deux étapes de la réaction enzymatique sont :



Cette réaction consomme de l'ATP et de l'oxygène pour produire l'émission d'un photon à partir du substrat de la luciférase (luciférine). L'activité luciférase est dépendante du pH. Elle est optimale à pH 8,2 et commence à décroître au dessous de 7,1 pour devenir presque nulle à pH 6,7. Les milieux cellulaires tamponnés utilisés dans cette étude ont un pH de 7,4. Par ailleurs, les cellules sont rincées avec du PBS avant d'être lysées dans un tampon de lyse tamponné, fourni par Promega pour obtenir une activité optimale de la luciférase.

Lorsque le gène de la luciférase s'exprime, les quantités d'ARNm et de protéine luciférase produites sont proportionnelles à l'activité du promoteur. De plus, la protéine luciférase est un monomère qui ne requiert aucune modification post traductionnelle. L'activité enzymatique est couplée de manière très étroite à la synthèse protéique. Les protéines luciférase sont actives dès qu'elles se séparent des ribosomes. Cette dynamique fait du gène luciférase un système rapporteur particulièrement adapté à l'étude des promoteurs et de leurs voies d'activation. La demi-vie de la protéine luciférase a été évaluée à 3 heures dans les cellules de mammifères et la demi-vie des ARNm à environ 6 heures (208).

L'activité luciférase quantifiée peut être influencée par le pH mais également par l'état de la cellule et de son expression génique. Le fait que les cellules exprimant la luciférase subissent un processus de mort cellulaire (de type nécrose ou apoptose), peut avoir des répercussions sur l'intensité mais également sur la stabilité du signal luciférase. Ces considérations sont particulièrement significatives dans cette étude où les promoteurs sont étudiés dans des cellules infectées par HSV-1 qui sont donc condamnées à mourir. En effet, les valeurs des tests luciférase après infection sont à considérer dans un système plus complexe que la transfection, notamment aussi parce que la cellule est soumise à des réponses à l'infection qui modifient l'expression génique. Les valeurs luciférase, en ce sens, sont un moyen sensible de mettre en évidence l'action des voies de signalisation ou l'effet de l'infection sur l'activité des promoteurs. En vertu de ces particularités, j'ai réalisés des expériences de mise au point et de calibration du système luciférase en condition d'infection (voir ci dessous).

Les résultats graphiques des figures 9 et 10 servent à présenter les possibilités et les limites de l'interprétation des résultats luciférase dans notre système d'infection par HSV-1. J'ai utilisé pour cela deux types cellulaires différents : VERO et HeLa.

De par sa grande sensibilité et sa grande réactivité, le système luciférase permet différentes normalisations au sein des résultats d'expériences.

La première normalisation concerne la normalisation par rapport au nombre de cellules. Pour établir ce rapport j'ai réalisé l'expérience de la figure 9 en infectant une quantité croissante de cellules VERO à m.o.i. 5 pendant 24h ; ainsi l'ensemble des cellules est infecté. Les cellules, quelque soit leur quantité, sont récoltées avec un même volume X de tampon auquel est ajouté un volume X de luciférine puis l'activité luciférase est mesurée

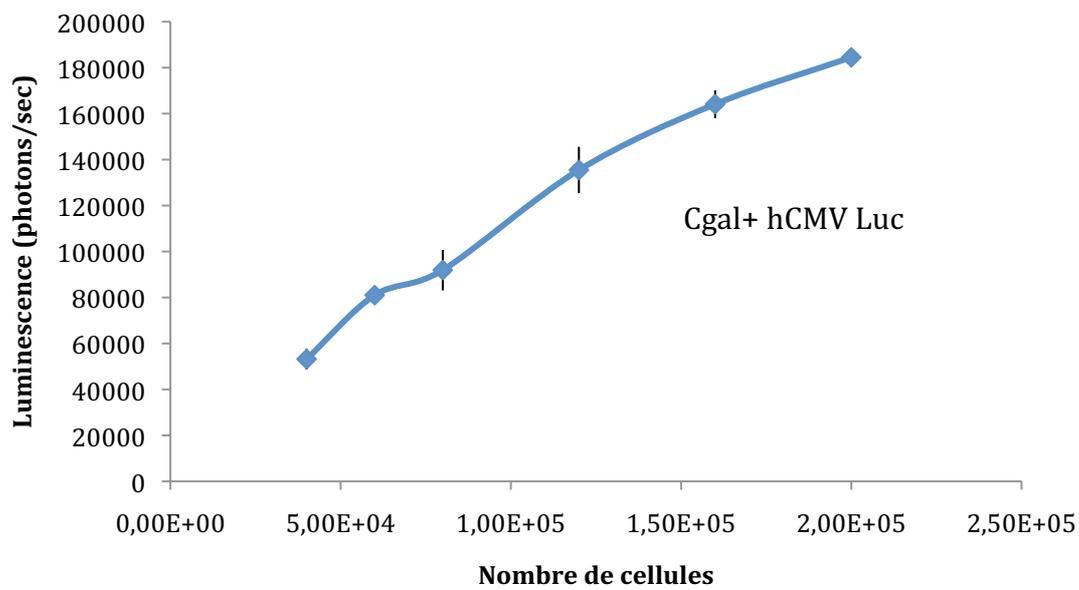


Figure 9 : Variation de la quantité de photons émis en fonction du nombre de cellules VERO infectées pendant 24 heures à m.o.i. 5. Expérience réalisée en triplicat.

Les résultats montrent que la quantité de photons récoltés est directement proportionnelle au nombre de cellules subissant l'infection par le virus recombinant hCMV Luc. En d'autres termes, ces résultats montrent que l'activité luciférase est fonction du nombre de cellules infectées de manière constante et croissante pour un nombre de cellules allant de  $5 \cdot 10^4$  à  $2 \cdot 10^5$ . La conclusion est que dans nos conditions expérimentales il est possible de normaliser les résultats de tests luciférase entre des expériences réalisées sur des nombres différents de cellules de la même lignée compris entre  $5 \cdot 10^4$  et  $2 \cdot 10^5$  et infectées à une m.o.i. de 5. Après cette normalisation, la comparaison entre deux types cellulaires, pour un promoteur particulier, montre la spécificité du promoteur pour un type cellulaire.

Dans la figure 9 bis, le graphique montre une évolution semblable de l'activité luciférase, permettant une comparaison de l'intensité et des cinétiques d'expression entre les deux types cellulaires. Néanmoins, les valeurs très différentes pour un même promoteur dans les deux types cellulaires ne permettent pas d'envisager une normalisation d'un type cellulaire par rapport à un autre. Dans la suite de cet exposé, les comparaisons de tests luciférase entre types cellulaires se feront après normalisation portant uniquement sur le nombre de cellules. On voit figure 9 bis que l'activité luciférase augmente puis se stabilise sous forme de plateau. Cette forme est identique bien qu'à des hauteurs et avec des cinétiques différentes pour les différents promoteurs testés

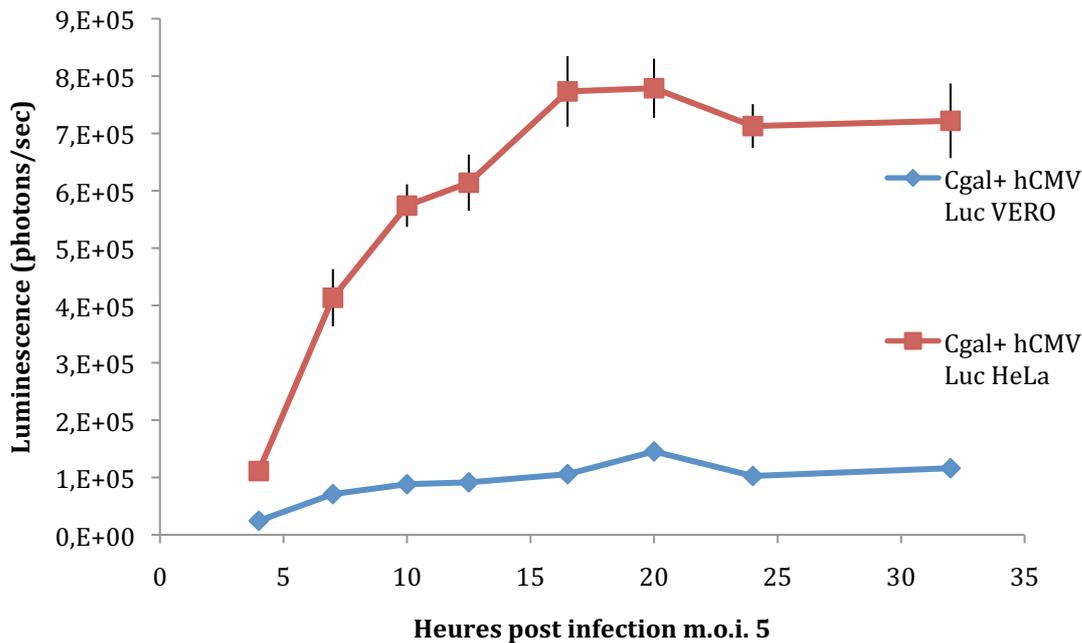


Figure 9 bis : Courbe d'activité luciférase à forte m.o.i.. Activités luciférase mesurées à partir de  $50 \cdot 10^3$  cellules HeLa ou VERO au cours d'une cinétique d'infection, à m.o.i. 5 avec le virus Cgal+ hCMV Luc.

Dans le cas de la comparaison de promoteurs, il est intéressant de savoir dans quelle mesure la variation de la m.o.i. du virus recombinant peut entraîner une variation de l'activité luciférase. Pour répondre à cette question, j'ai infecté un nombre identique de cellules VERO ( $2 \cdot 10^5$ ) à différentes m.o.i. allant de 5 à 0,01. Les différentes conditions sont récoltées avec un même volume X de tampon auquel est ajouté un volume X de luciférine puis l'activité luciférase est mesurée. Les résultats, présentés figure 9 ter, montrent que, pour une m.o.i. supérieure à 1, la variation de l'activité luciférase n'est pas statistiquement significative. Par conséquent, la comparaison des promoteurs est possible à condition que les titres connus permettent de rester aux alentours de la m.o.i. choisie et si cette dernière est supérieure à 1.

Néanmoins, pour plus de précision dans la comparaison et quand cela est possible, on peut utiliser une deuxième normalisation, basée sur l'utilisation des tests  $\beta$ -galactosidase. L'activité  $\beta$ -gal permet de corriger les incertitudes sur le titre des stocks viraux. Le gène de la  $\beta$ -gal s'exprime au cours du cycle viral sous contrôle du promoteur hCMV et est le même dans tous les virus recombinants dérivés du virus Cgal+. L'activité  $\beta$ -gal permet donc de normaliser les infections en fonction du nombre de particules ayant réellement infecté la population cellulaire étudiée. Les résultats de la figure 10 montrent que le profil de l'activité  $\beta$ -gal n'est pas le même en fonction du type cellulaire, interdisant toute comparaison entre type de cellules différents. Du fait que l'activité du

promoteur hCMV varie aussi avec le temps, cette comparaison n'est valable qu'à un temps d'infection donné et non entre différentes heures post infection. La correction consiste à diviser la valeur luciférase mesurée, par la valeur  $\beta$ -gal correspondante. Les valeurs luciférase ainsi corrigées sont exprimées en « unité relative de luciférase » ou RLU. Cette normalisation n'a été utilisée que dans les expériences des figures 27 et 28.

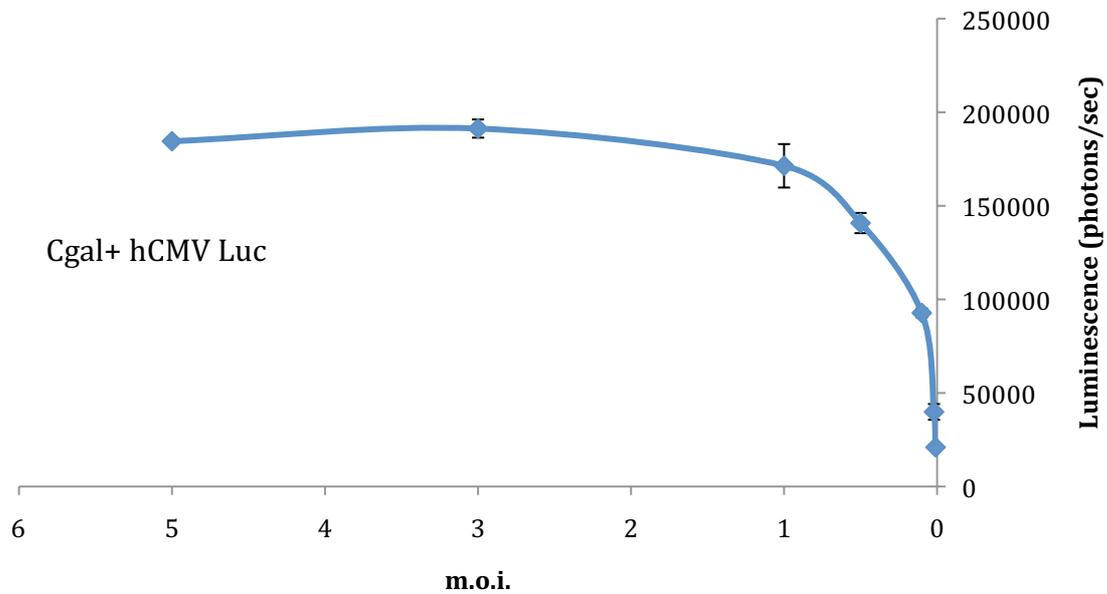


Figure 9 ter : Evolution de l'activité luciférase en fonction de la m.o.i. Activité luciférase mesurée à partir de  $2.10^5$  cellules VERO infectées à différentes m.o.i. avec le virus Cgal+ hCMV Luc.

Enfin, il est important de souligner que, contrairement à une évaluation ponctuelle, un ensemble de valeurs luciférase réalisées à différents temps post infection, fournit une signature plus riche de l'activité du promoteur contrôlant la luciférase, qu'une donnée isolée même sous forme de triplicat, établie à un moment donné.

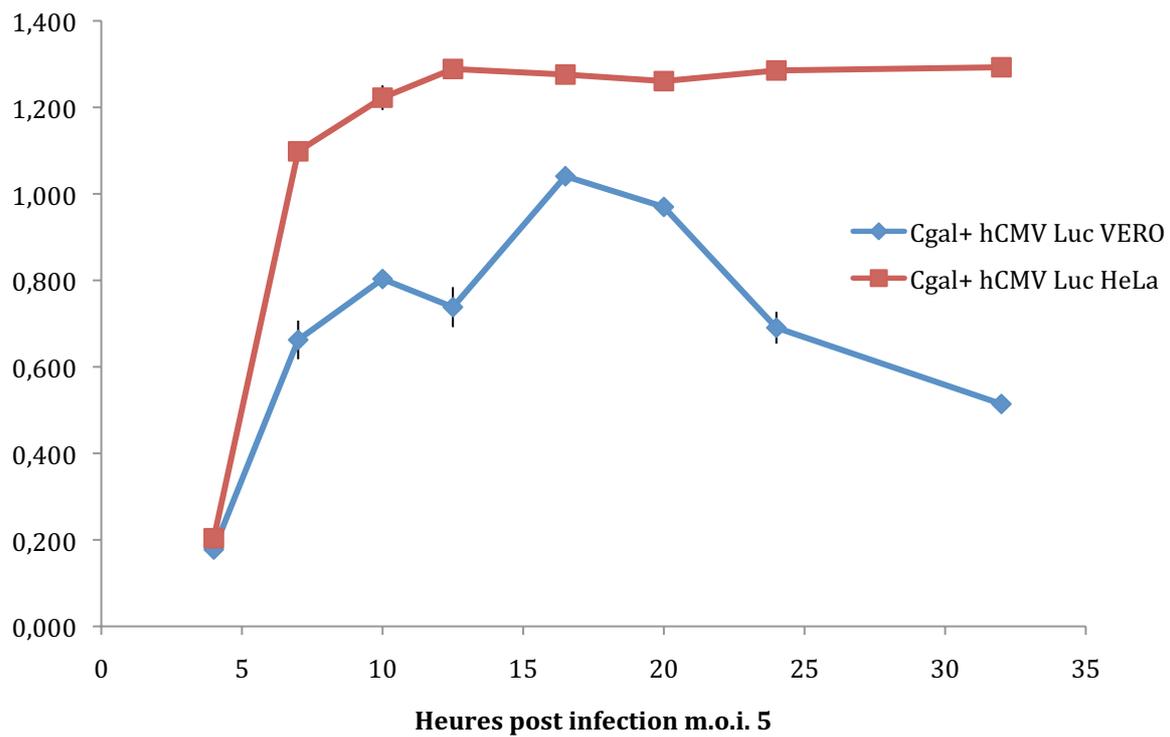


Figure 10 : Courbe d'activité  $\beta$ -gal à forte m.o.i.. Activités  $\beta$ -gal mesurées à partir de  $50.10^3$  cellules HeLa ou VERO au cours d'une cinétique d'infection à m.o.i. 5 avec un virus Cgal+ hCMV Luc.

## 5. Utilisation de la déféroxamine (DFO) pour mimer les conditions d'hypoxie.

La déféroxamine, un chélateur du fer, permet de reproduire un des aspects de l'hypoxie qui est la stabilisation du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$ . Le facteur HIF-1 $\alpha$  stabilisé se dimérise et se fixe sur des séquences spécifiques d'ADN appelées HRE (hypoxia-responsive-element) situées dans les régions régulatrices des gènes qui répondent à l'hypoxie. Tel que nous l'avons vu précédemment (figures 4 et 6), le DFO permet de stimuler de manière très significative l'activité du promoteur 9xHRE Luc, au moins dans des cellules transfectées. Le DFO possède, par ailleurs, une activité cytotoxique et induit l'apoptose via la voie mitochondriale (74). Cette activité cytotoxique (voir figure 11) est corrélée à un arrêt de la croissance cellulaire particulièrement marqué au delà de 24 heures de traitement (figure 12). Le DFO induit également une diminution du titre viral (figure 13) mais qui reste relativement faible au moins pendant les premières 24 heures de l'infection. Parce qu'elle permet de stimuler l'activité du promoteur 9xHRE avec un minimum de toxicité, la dose de 100 $\mu$ M de DFO sera utilisée dans les prochaines expériences. Le DFO est également mieux adapté aux expériences courtes, inférieures à 24h. Pour les courbes de croissance virale qui se prolongent au delà, le DFO est pénalisant. Dans l'étude des virus oncolytiques, les expériences seront réalisées dans un incubateur à hypoxie où le taux d'oxygène est maintenu à 1%.

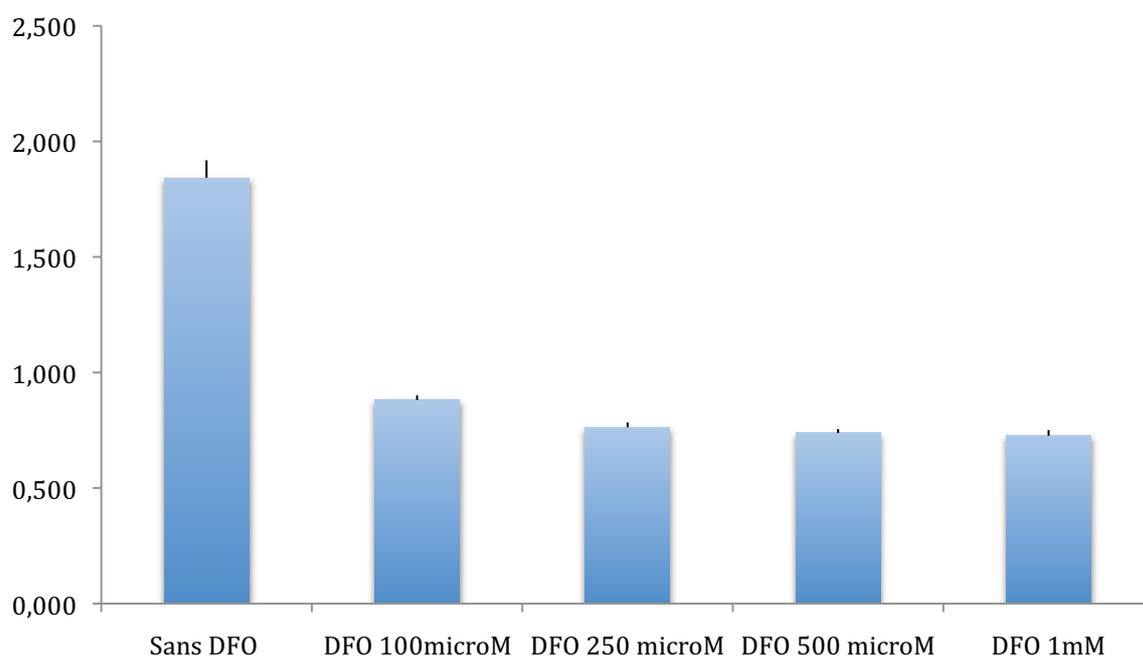


Figure 11 : Test de survie cellulaire au MTT (Méthyl Thiazol Tétrazolium) réalisé à partir de cellules VERO. Le test est réalisé à 24 h post-traitement avec le DFO. Les valeurs en ordonnée sont d'autant plus basses que la mortalité est importante.

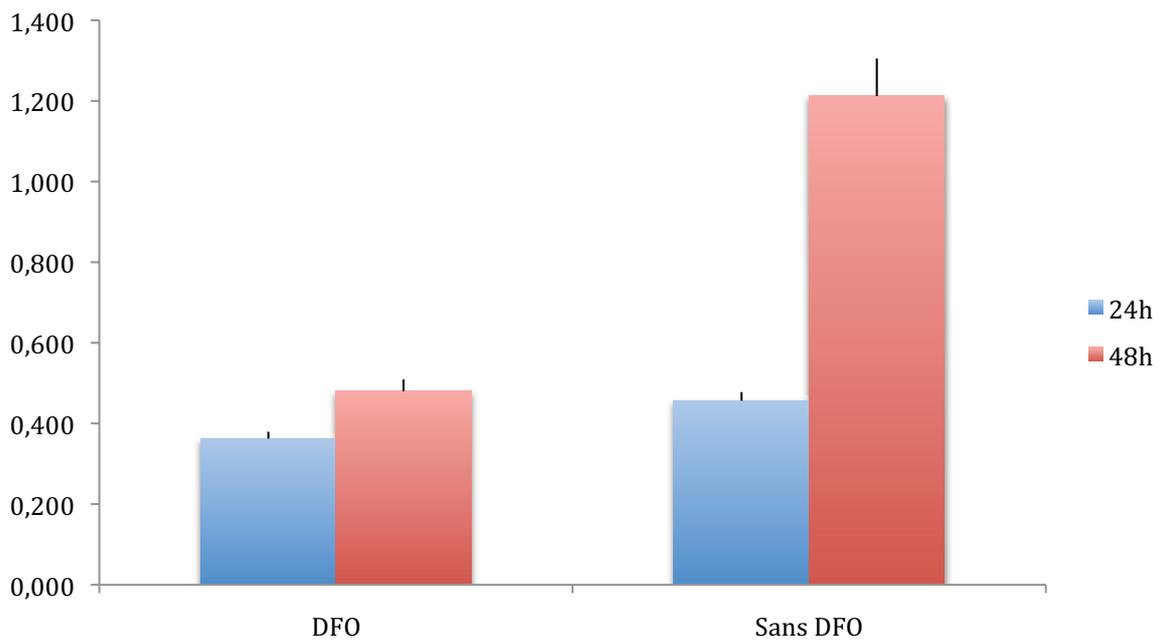


Figure 12 : Croissance de cellules Huh7 en présence ou en absence de 250 $\mu$ M de DFO. L'incorporation de cristal violet est mesurée 24 et 48 heures après le début du traitement.

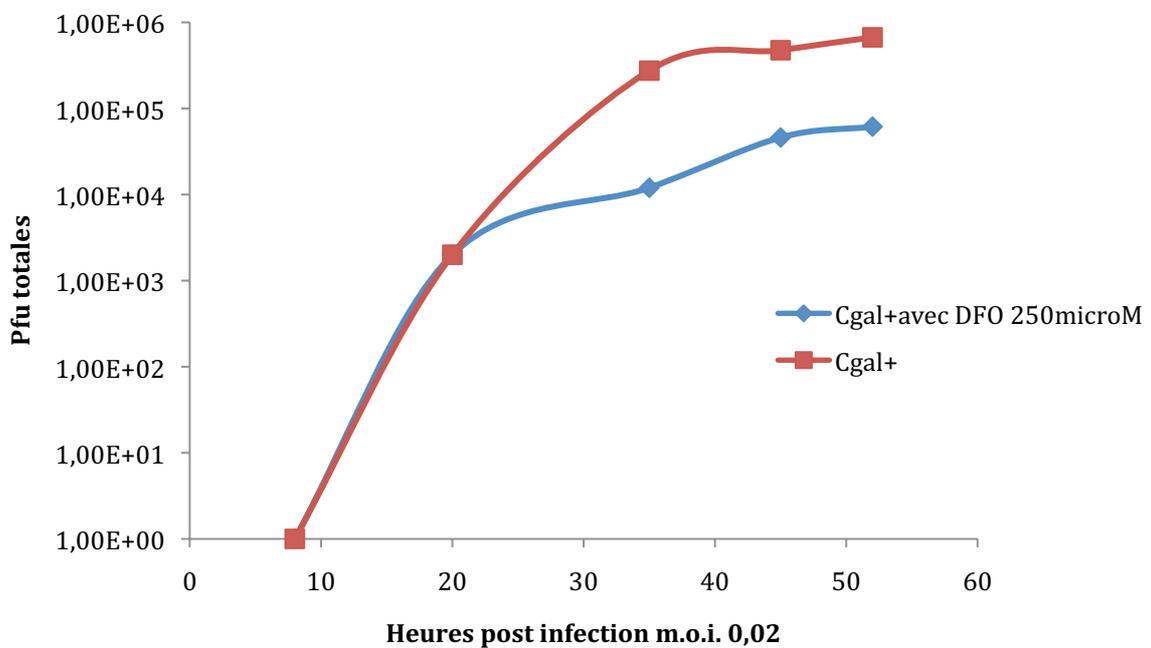


Figure 13 : Courbe de croissance du virus Cgal+ après infection de cellules VERO à une m.o.i. de 0,02 en présence (bleu) ou en absence (rouge) de 250  $\mu$ M de DFO.

## 6. Vérification des capacités de réplication des virus recombinants

Pour évaluer les conséquences éventuelles des modifications apportées à la région IGR20 sur les capacités de réplication des virus recombinants, j'ai réalisé les courbes de croissance de ces virus sur cellules VERO. Les courbes présentées figure 14 montrent que tous les virus recombinants, indépendamment du promoteur contrôlant l'activité luciférase, se multiplient de manière similaire. Le fait que les virus se multiplient de la même façon est la condition essentielle à la comparaison des promoteurs entre eux. A 54 hpi, la production de virions recombinants est diminuée d'un facteur 10 par rapport à la production du virus parental Cgal+, ce qui est une différence reconnue comme significative dans le cadre de la comparaison des pouvoirs répliatifs de virus HSV-1 sauvages ou mutants. Néanmoins, la forme de la courbe démontre une réelle capacité de réplication pour tous les virus recombinants. La chute de la production observée pour tous les virus recombinants à 6hpi correspond à la période du cycle pendant laquelle il n'y a plus de particule infectieuse fonctionnelle, c'est à dire, entre le désenveloppement du virus au niveau de la membrane plasmique et la fabrication de capsides enveloppées après le début de synthèse d'ADN viral (voir figure I dans l'introduction).

Des tests d'activité luciférase réalisés en parallèle de ces courbes de croissance, permettent une première étude de l'activité des promoteurs. Les valeurs de la figure 15 doivent être considérées d'après la figure 14 comme des valeurs moyennes de l'activité luciférase au sein d'une population de cellules dans laquelle les virus sont en train de se multiplier de manière similaire. Les cellules sont infectées à une m.o.i. de 0,02 pfu/cellule, ce qui signifie qu'aux premières heures de l'infection, une cellule sur 50 est infectée en moyenne. Au fur et à mesure que le virus se multiplie et se propage, le nombre de cellules infectées augmente et l'activité luciférase devient plus importante. Ainsi aux heures tardives, le profil d'expression luciférase devient plus significatif. Dans ce contexte, on peut alors noter que le promoteur hCMV est le plus fort, que E2F1 possède une activité intermédiaire suivie de 9xHRE (en absence de DFO).

Les promoteurs potentiellement spécifiques d'HCC (AFP, ANGPTL3) sont inactifs sur les cellules VERO, ce qui confirme la spécificité d'expression dans les HCC de ces promoteurs, observée auparavant. Le promoteur hTERT est également inactif lorsqu'il est dans le génome viral. De ce fait, le virus Cgal+ hTERT Luc ne sera plus utilisé dans les prochaines expériences.

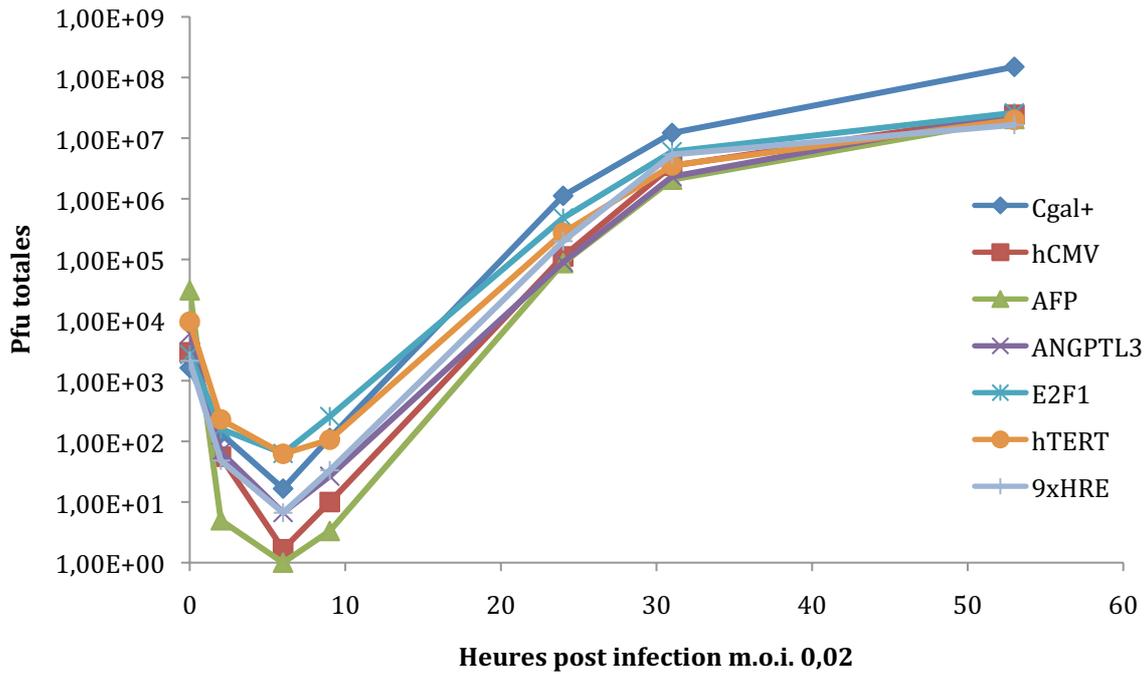


Figure 14 : Courbe de croissance du virus Cgal+ et des recombinants dérivés de Cgal+ exprimant la luciférase, sur  $1.10^6$  cellules VERO infectées à une m.o.i. de 0,02.

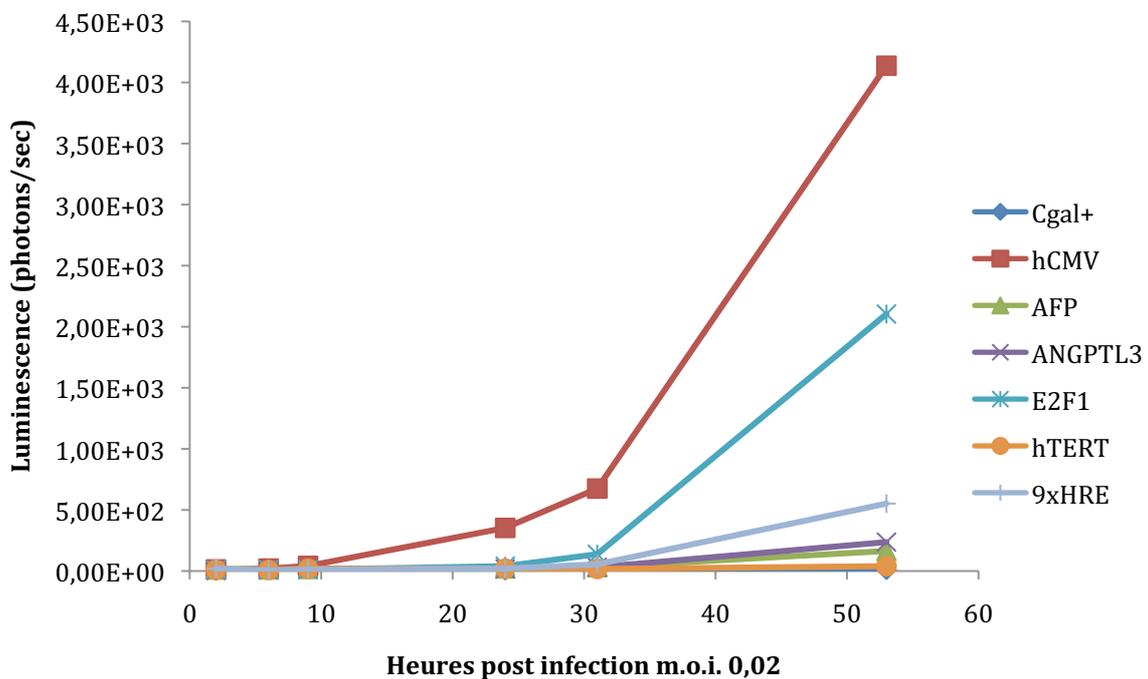


Figure 15 : Activité luciférase au cours du temps post infection à faible m.o.i. des différents promoteurs d'intérêts sur cellules VERO. Tests d'activité luciférase réalisés en parallèle de la courbe de croissance de la figure 14.

### III. Etude des promoteurs de ciblage

#### 1. Comportement d'un virus recombinant sur différentes lignées cellulaires et étude de son promoteur. Cas des virus ANGPTL3 et hCMV

Les expériences dont les résultats sont présentés dans les figures 16 à 19, avaient pour objectif de tester la permissivité des différentes lignées cellulaires de référence à l'infection HSV-1 mais également le comportement des promoteurs ANGPTL3 (figures 16 et 17) et hCMV (figures 18 et 19) au cours de l'infection. La première conclusion est que toutes ces cellules autorisent la multiplication du virus HSV-1, bien que manière un peu différente. Cette capacité de réplication varie donc en fonction des cellules mais est identique pour Cgal+ ANGPTL3 Luc et Cgal+ hCMV Luc (comparer les figures 16 et 18). On peut retenir de ces deux figures, que la production de virions à 54hpi est 10 000 fois plus faible dans les hépatocytes primaires que dans les cellules VERO ou HepG2, mais similaire à celle des cellules HeLa. Les cellules Huh7, Hep3B, WRL68 et Gli36 présentent des permissivités intermédiaires très similaires. Cette situation rend plus objective la comparaison de l'activité d'un promoteur entre ces différentes lignées.

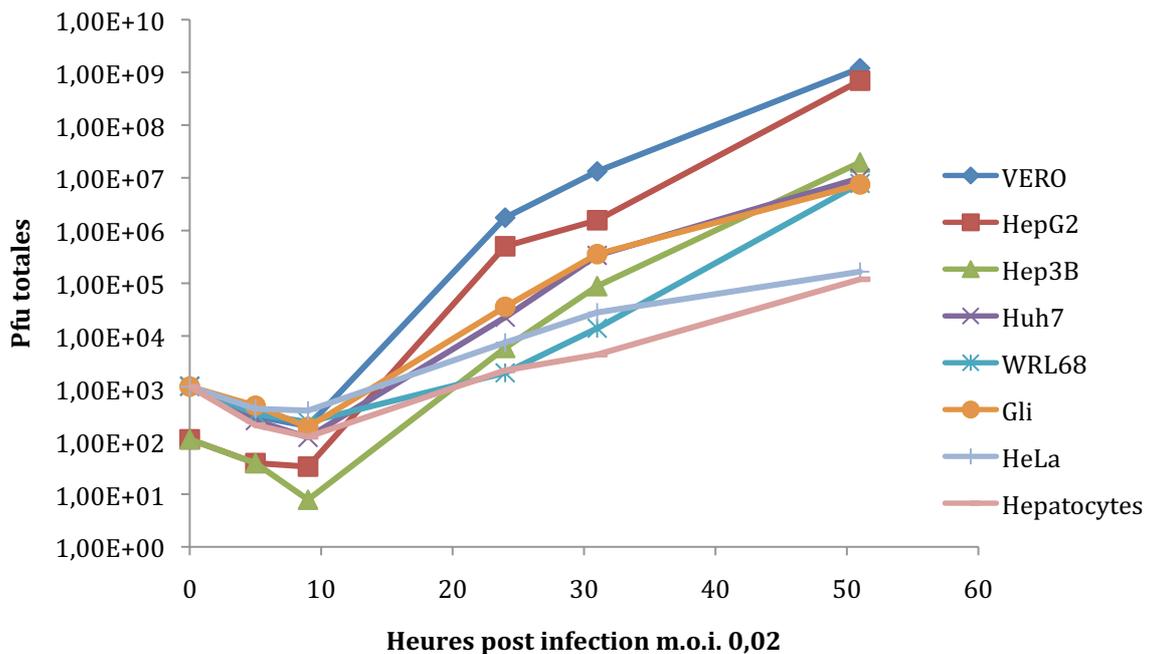


Figure 16 : Courbe de croissance du virus HSV-1 Cgal+ ANGPTL3 Luc dans différents types cellulaires (infection à une m.o.i. de 0,02).

Les tests luciférase réalisés en parallèle de ces courbes de croissances (figures 17 et 19) illustrent le comportement des promoteurs ANGPTL3 et hCMV lors de la propagation du virus et montrent que ces promoteurs peuvent être actifs dans tous les types cellulaires, mais avec des intensités différentes. Comme dans l'expérience de la figure 15, l'activité luciférase est tributaire de la charge virale, qui augmente au fur et à mesure des cycles de réplication et elle varie donc avec la permissivité de chaque type cellulaire. L'échelle logarithmique utilisée dans les figures 17 et 19 met en évidence les variations et les

changements de pente de la cinétique d'activité des promoteurs lors d'une infection à m.o.i. 0,02. Les cellules VERO et HepG2 montrent une activité plus précoce du promoteur ANGPTL3 (figure 17). Dans les cellules Huh7 ou Hep3B, moins permissives, l'activité luciférase commence plus tardivement. Le promoteur hCMV (figure 19) semble moins dépendant des conditions influençant la transcription aux premières heures du cycle et propres à chaque type cellulaire.

Les figures 20 à 23 reprennent une partie des résultats des figures 16 à 19 pour se focaliser plus précisément sur l'activité des promoteurs ANGPTL3 et hCMV dans les lignées de cellules HCC Huh7 et Hep3b, ainsi que dans les hépatocytes primaires. Aux heures plus tardives de l'infection à faible m.o.i., après plusieurs cycles de réplication, les figures 21 et 23 montrent que le promoteur ANGPTL3 reste inactif dans les cellules d'hépatocytes primaires mais devient actif dans les cellules Huh7 et Hep3B (figure 21) et ceci malgré la multiplication évidente du virus dans ces cellules (figure 20). Par contre, le promoteur non spécifique hCMV est actif dans les 3 types cellulaires (figures 22 et 23). On remarquera donc que, malgré la production de particules virales dans tous les types cellulaires, l'activité du promoteur ANGPTL3 est quasi nulle dans les hépatocytes mais très significative dans les cellules Hep3B et Huh7. Ces résultats montrent donc que l'activité du promoteur ANGPTL3, contrairement à celle du promoteur hCMV, est dépendante du type cellulaire.

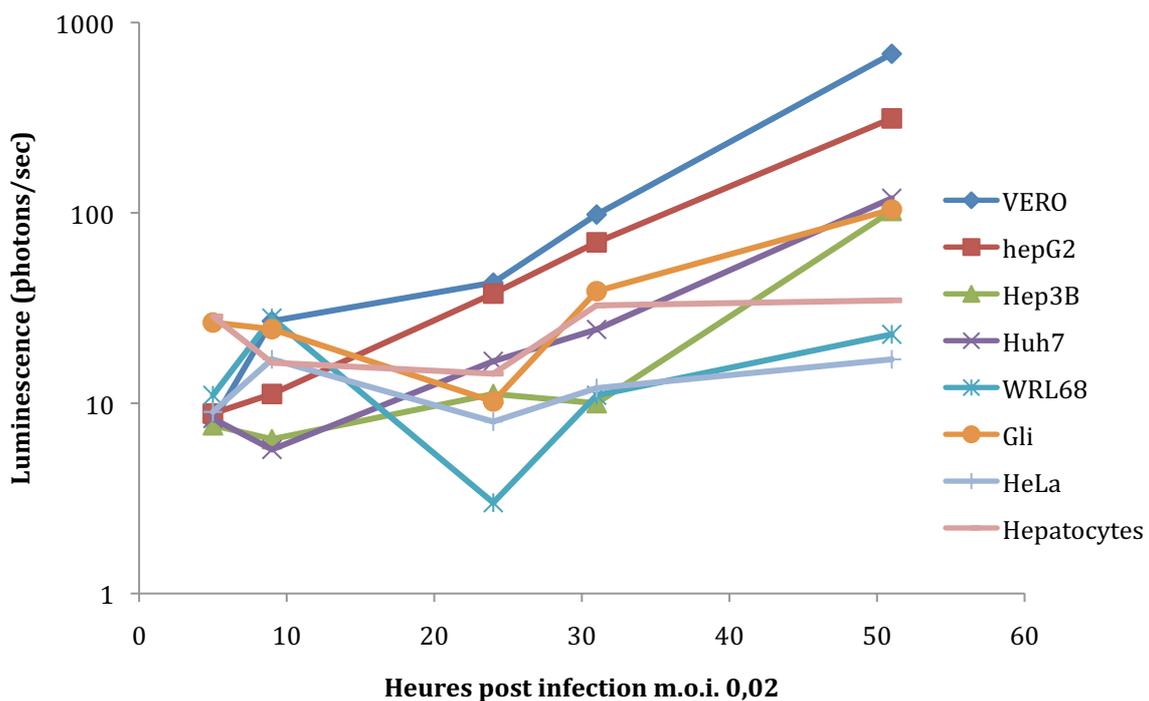


Figure 17 : Activité luciférase dépendant du promoteur ANGPTL3 au cours du temps post infection à faible m.o.i. sur différentes lignées cellulaires. Tests luciférase réalisés en parallèle de la courbe de croissance de la figure 16.

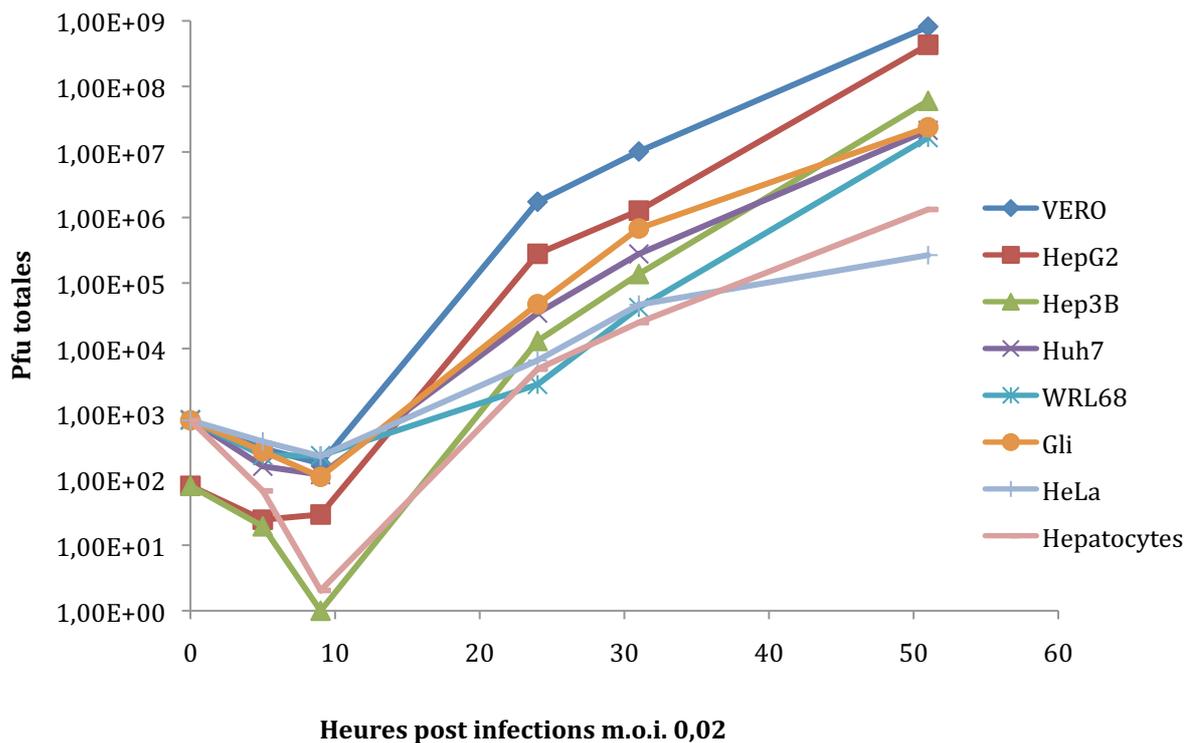


Figure 18 : Courbe de croissance du virus HSV-1 Cgal+ hCMV Luc dans les différents types cellulaires (infection à une m.o.i. 0,02).

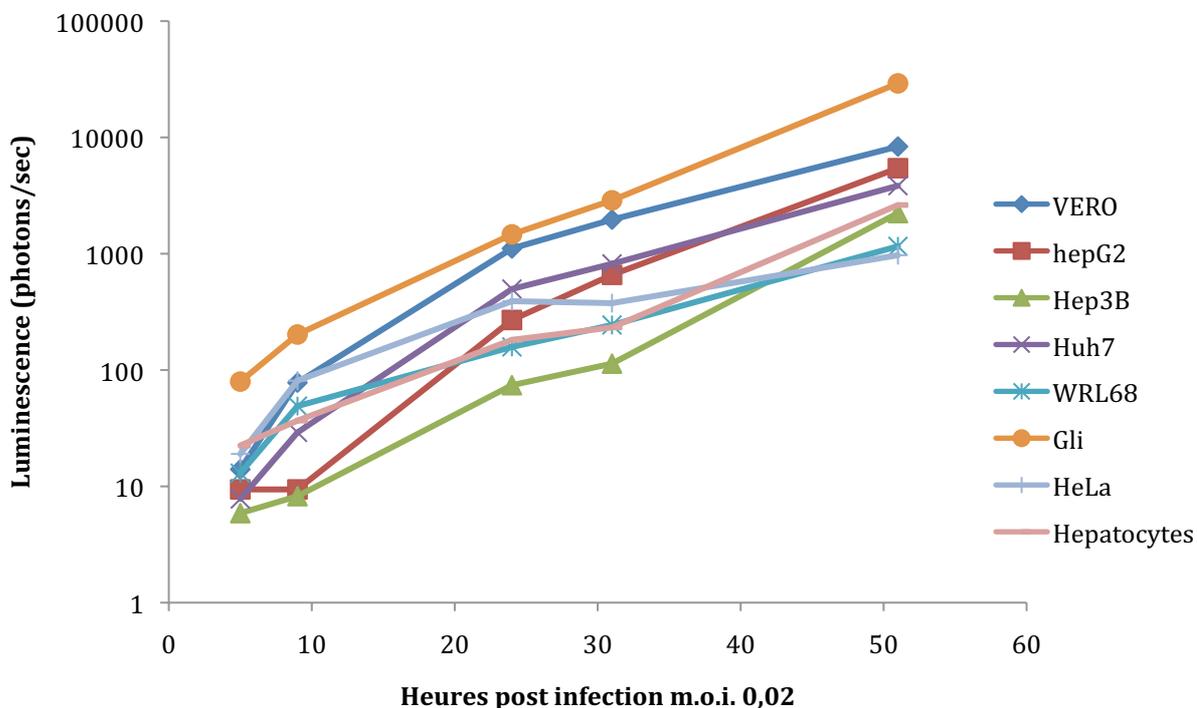


Figure 19 : Activité luciférase au cours du temps post infection à faible m.o.i. Tests luciférase réalisés en parallèle de la courbe de croissance de la figure 18.

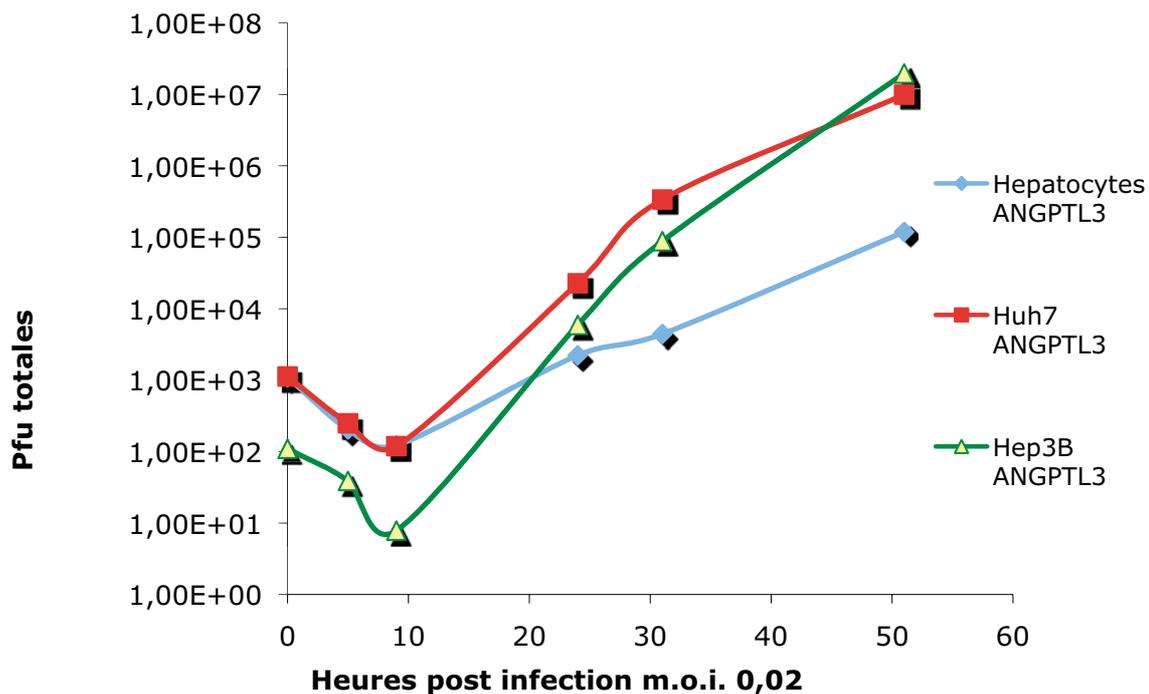


Figure 20 : Courbe de croissance du virus Cgal+ ANGPTL3 Luc dans des hépatocytes primaires et dans des lignées de cellules d'HCC (Hep3B et Huh7) infectées avec une m.o.i. de 0,02.

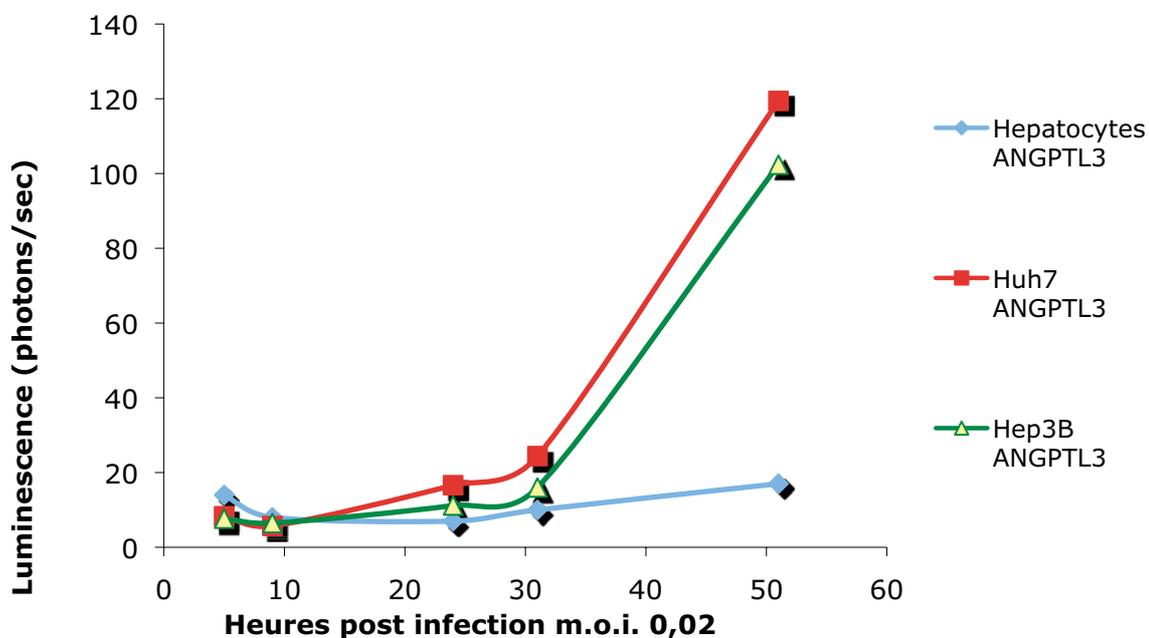


Figure 21 : Cinétique d'activation du promoteur ANGPTL3 en fonction du type cellulaire. Tests d'activité luciférase réalisés en parallèle de la courbe de croissance de la figure 20.

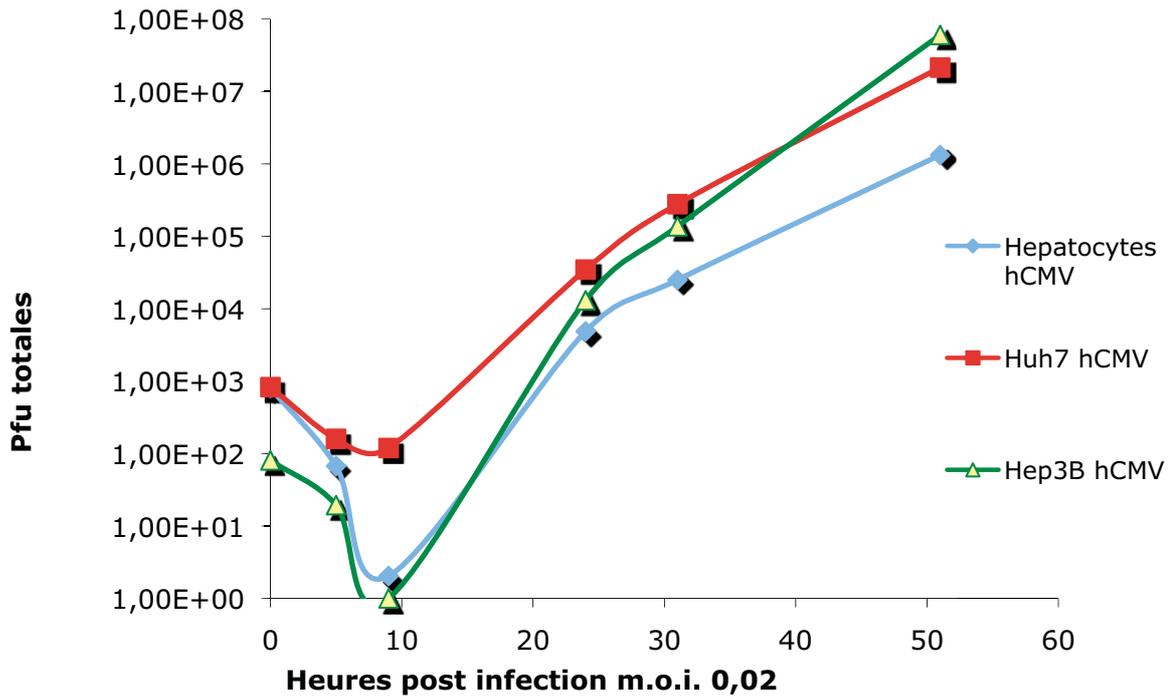


Figure 22 : Courbe de croissance du virus Cgal+ IGR20 hCMV Luc dans des hépatocytes primaires et dans des lignées de cellules HCC (Hep3B et Huh7) infectées avec une m.o.i. de 0,02.

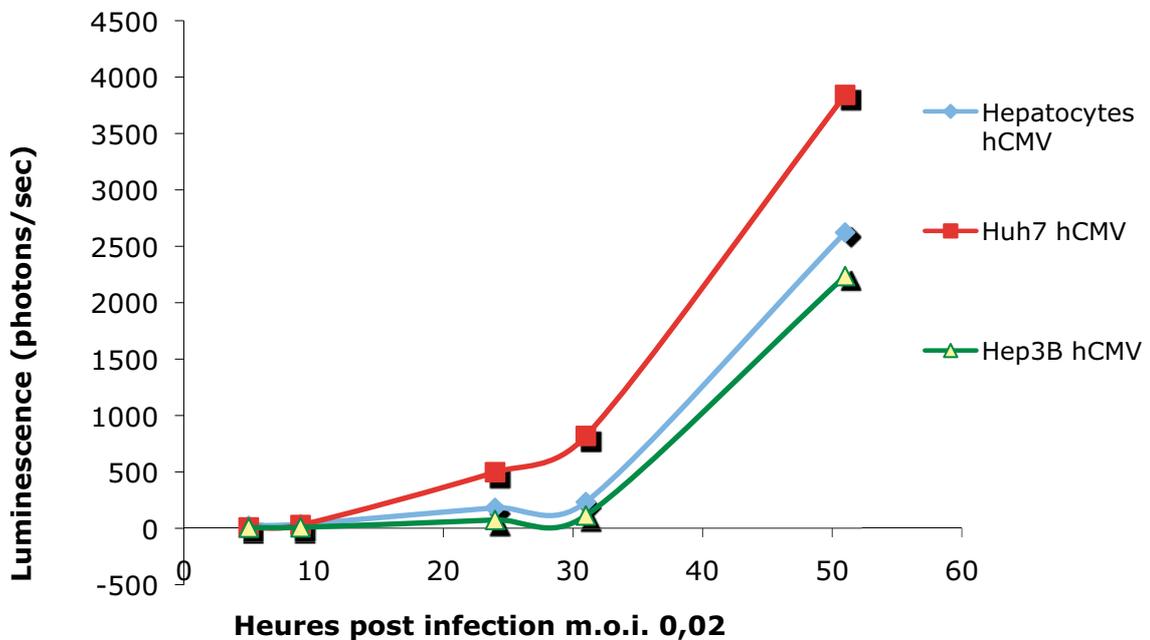


Figure 23 : Cinétique d'activation du promoteur hCMV en fonction du type cellulaire. Tests d'activité luciférase réalisés en parallèle de la courbe de croissance de la figure 22.

L'ensemble de ces résultats suggère que, lorsque les cellules sont infectées à faible multiplicité d'infection, l'activité de chaque promoteur dépend à la fois de la capacité inhérente au promoteur de s'exprimer dans un type cellulaire particulier, et de la permissivité spécifique de chaque type cellulaire à la multiplication virale d'HSV-1.

## 2. Etude de l'activité des promoteurs d'intérêt au cours d'un seul cycle de réplication

### a. Etudes de cinétique des différents promoteurs d'intérêt

Dans les paragraphes suivants, j'ai étudié l'activité des promoteurs dans le contexte d'un cycle viral unique. C'est le cas lors d'une infection avec une m.o.i. supérieure à 1, en l'occurrence une m.o.i. 5, où toutes les cellules sont infectées dès le début de l'infection et, par conséquent, les virions produits après le premier cycle de réplication ne trouvent plus de cellules saines dans lesquelles se propager. Les événements observés sont donc représentatifs des phénomènes se produisant en cycle unique et permettent de mesurer des paramètres moléculaires se rapportant à un seul cycle de réplication.

La figure 24 montre l'activité des différents promoteurs dans la lignée Huh7, au cours d'une cinétique d'infection à 5 pfu/cellules. On peut observer dans cette figure que les promoteurs AFP, ANGPTL3 et 9xHRE en l'absence de DFO, ont une cinétique d'activité relativement similaire, qui est détectée à partir de 4hpi. L'activité du promoteur 9xHRE augmente très significativement en présence de DFO, et ceci dès 2hpi, tout comme celle des promoteurs ADH6 et hCMV, qui restent néanmoins plus faibles.

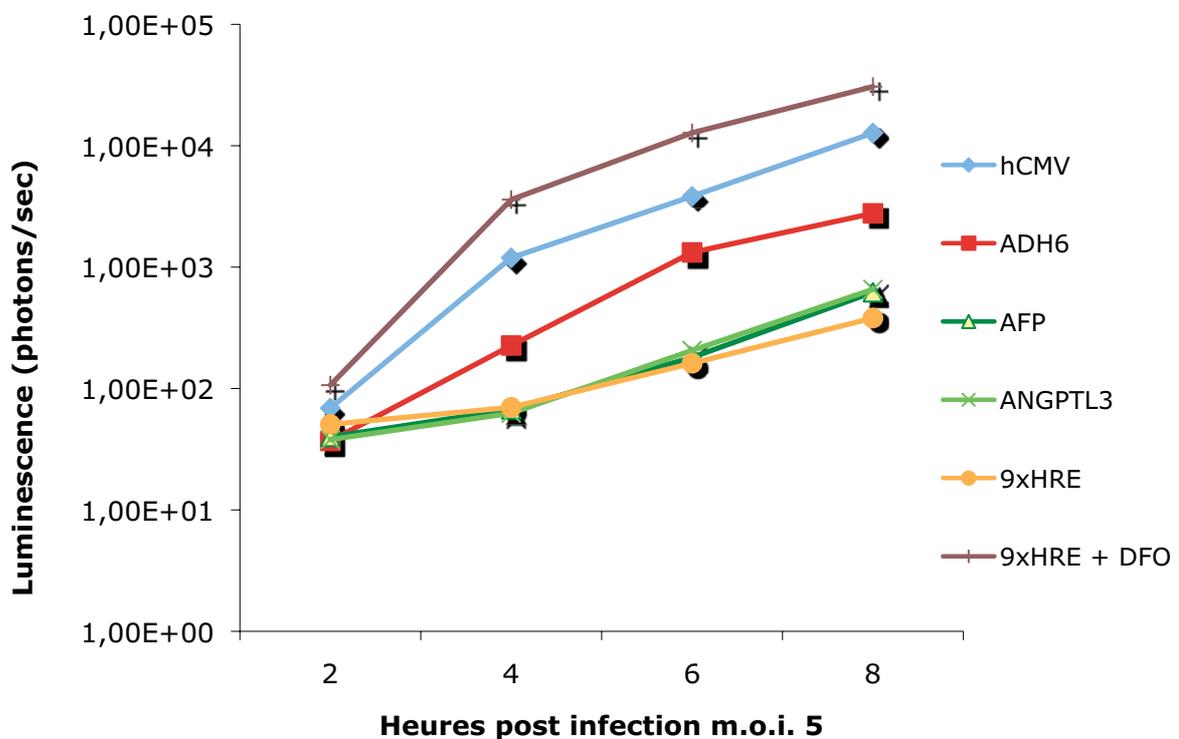


Figure 24 : Cinétique d'activation des promoteurs d'intérêt. Tests luciférase mettant en évidence les différentes cinétiques d'activité des promoteurs cellulaires dans les cellules Huh7 infectées à m.o.i. 5.

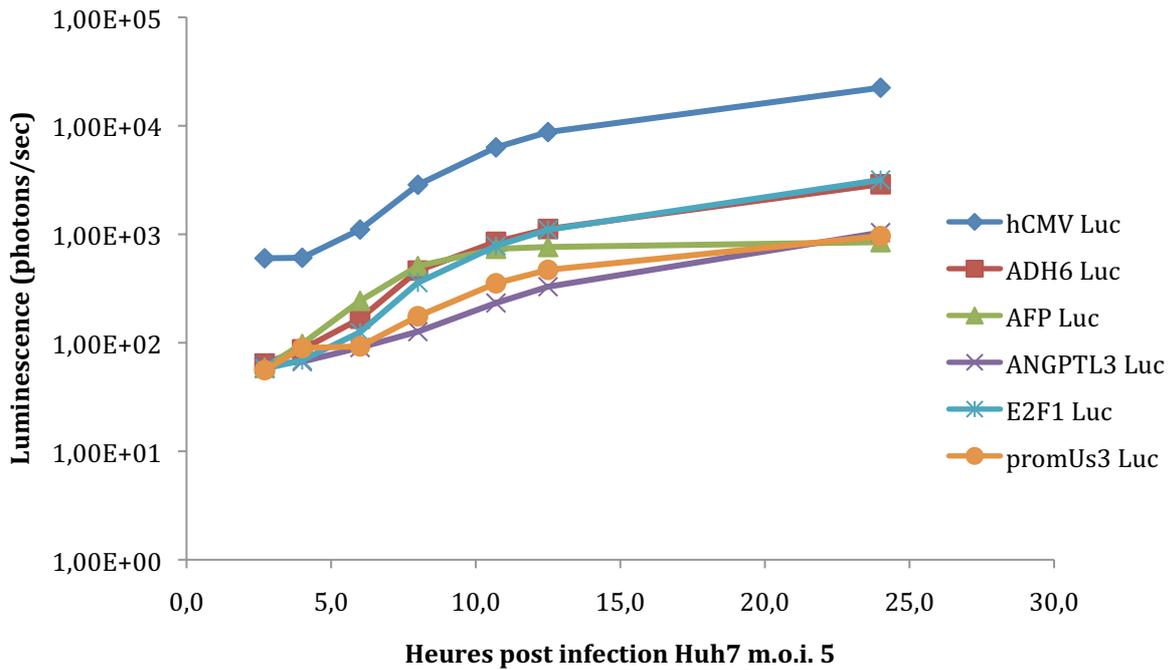


Figure 24 bis : Cinétique d'activation des promoteurs d'intérêt. Tests luciférase mettant en évidence les différentes cinétiques d'activité des promoteurs cellulaires dans les cellules Huh7 infectées à m.o.i. 5 par les virus Cgal+ Prom Luc. Chaque point représente la moyenne de trois expériences.

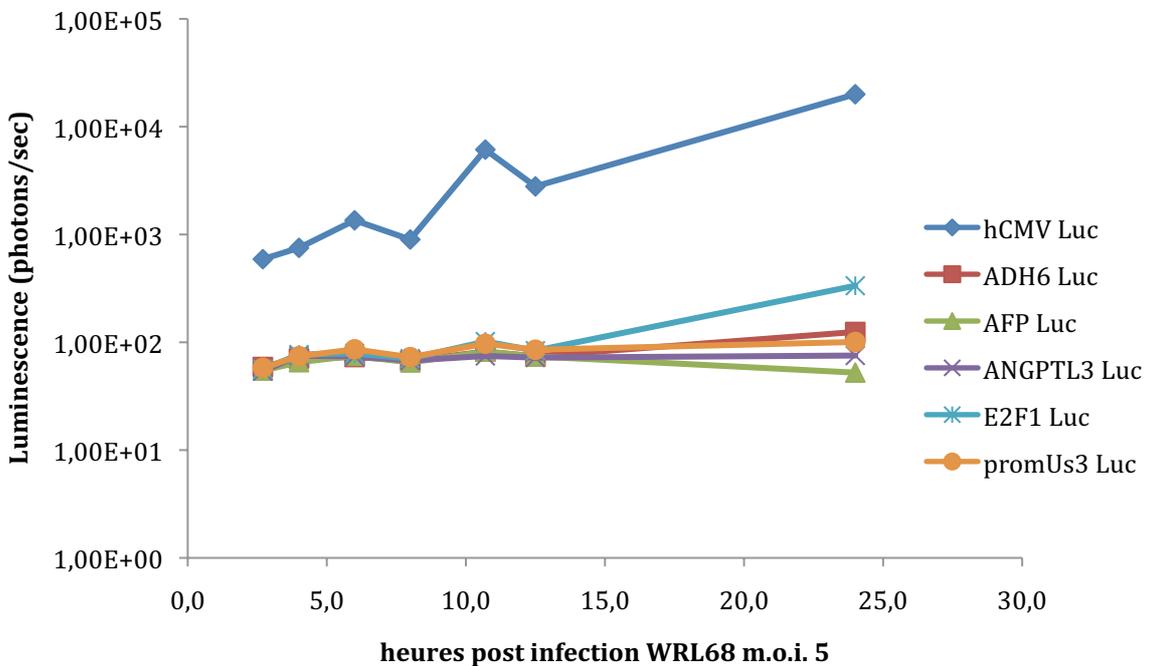


Figure 24 ter : Cinétique d'activation des promoteurs d'intérêt. Tests luciférase mettant en évidence les différentes cinétiques d'activité des promoteurs cellulaires dans les cellules WRL68 infectées à m.o.i. 5 avec les virus Cgal+ Prom Luc. Chaque point représente la moyenne de trois expériences.

Les figures 24 bis et 24 ter reprennent les mêmes conditions expérimentales que celles de la figure 25 mais l'étude est menée simultanément sur deux types cellulaires Huh7 et WRL68 et inclue le promoteur Us3. Le profil d'activation des promoteurs est conservé sur Huh7. Les promoteurs ANGPTL3 et AFP ont une cinétique proche de celle du promoteur Us3. Dans les cellules WRL68, l'activité de tous les promoteurs est diminuée à l'exception de celle du promoteur hCMV et, dans une moindre mesure du promoteur E2F1. Il est intéressant de constater que le promoteur Us3 est également inactif alors que le virus HSV-1 se réplique efficacement dans ces cellules (figure 18). L'analyse des promoteurs AFP et ANGPTL3 confirme qu'ils ont une activité minimale dans ces cellules dérivées d'hépatocytes.

L'expérience montrée dans la figure 25 confirme avec quelques petites modifications, l'augmentation de l'activité luciférase exprimée par les différents promoteurs dans les figures 24 et 24 bis.

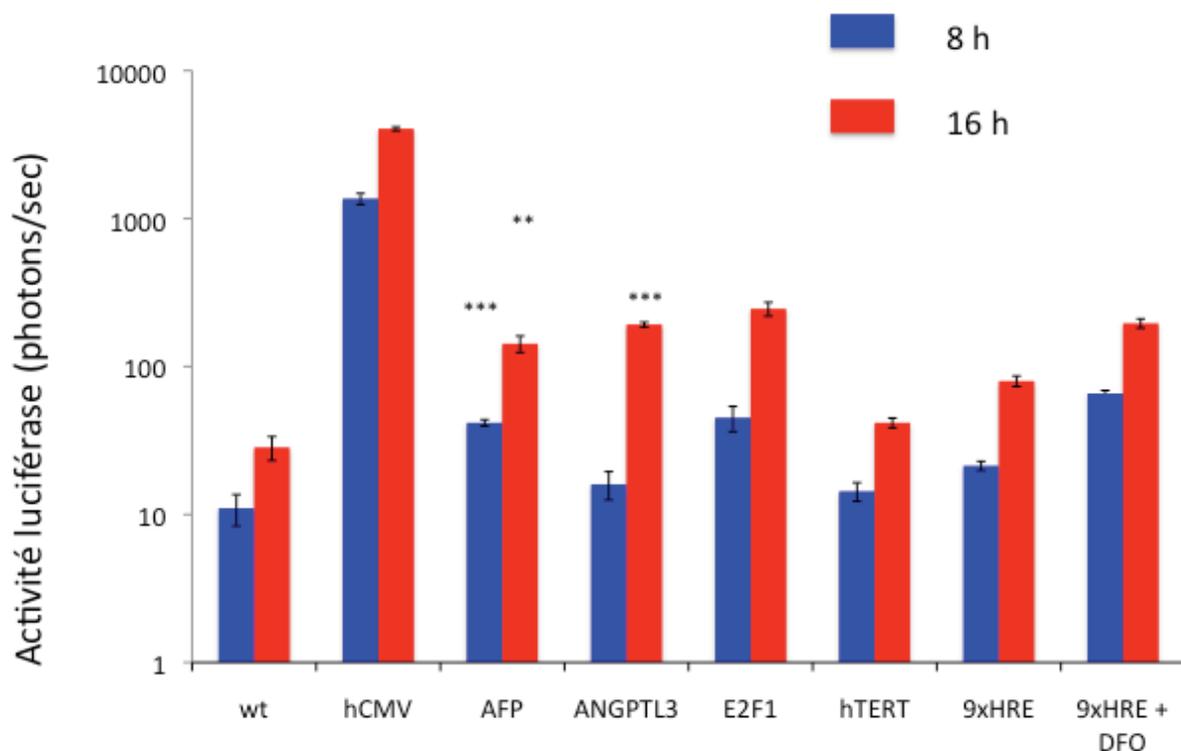


Figure 25 : Cinétique sur deux points et comparaison des promoteurs. Tests luciférase réalisés à 8 et 16 hpi à partir de  $3,5 \cdot 10^5$  cellules Huh7 infectées avec les virus recombinants dérivés de Cgal+. Les valeurs de luciférase des promoteurs hTERT, ANGPTL3 et 9xHRE ne sont pas différentes du taux basal à 8hpi.

Les figures 24 et 25 nous montrent donc des cinétiques d'activité, que nous appellerons, absolues, c'est à dire, variables seulement en fonction du temps post-infection. Cependant, comme nous l'avons indiqué dans la partie I de l'introduction, les promoteurs viraux HSV-1 peuvent être divisés en 3 catégories cinétiques ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) sur la base de leur dépendance vis à vis de 2 évènements moléculaires, à savoir (i) la présence des protéines activatrices très précoces et (ii) la réplication de l'ADN viral.

## **b. Dépendance des promoteurs cellulaires vis à vis des fonctions d'HSV-1**

Les expériences suivantes ont donc pour objectif d'évaluer la dépendance éventuelle de l'activité des différents promoteurs cellulaires vis à vis du cycle de réplication virale, non pas en fonction des temps post-infection, mais en fonction des événements moléculaires du cycle HSV-1, c'est-à-dire, présence de protéines virales très précoces et réplication de l'ADN viral. Il s'agit dans ce chapitre d'étudier si les promoteurs cellulaires placés dans le génome HSV-1 se comportent comme des promoteurs viraux  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ . L'acide phosphonoacétique (PAA) est un inhibiteur de la DNA polymérase virale et bloque donc la réplication de l'ADN viral. Par conséquent, les promoteurs viraux qui dépendent de la réplication de l'ADN viral pour être actifs (promoteurs  $\gamma$  ou tardifs), ne s'expriment pas en présence de PAA, et le cycle de réplication s'arrête pendant la phase d'expression  $\beta$ . Dans ces conditions, seuls les promoteurs  $\alpha$  et  $\beta$  sont actifs. La mise au point de ces expériences a nécessité de modifier le protocole du test  $\beta$ -gal ( $\beta$ -galactosidase Enzyme Assay System) tel que fourni par Promega. Le tampon de lyse RLB a été remplacé par le Glo Lysis Buffer (promega) et la réaction enzymatique de la  $\beta$ -galactosidase a été stoppée par une solution de Tris base 1M en remplacement du carbonate de sodium. Les virus de souche D30EBA n'expriment pas la protéine essentielle ICP4. Par conséquent, les promoteurs  $\beta$  et  $\gamma$  ne pourront pas s'exprimer et seuls les promoteurs  $\alpha$ , ne dépendant pas de la présence d'ICP4, seront actifs dans ces conditions d'infection. L'absence du gène rapporteur de la  $\beta$ -galactosidase dans le génome des virus D30EBA ne nous permet pas de normaliser cette infection par rapport à l'expression interne  $\beta$ -gal. Le temps post infection choisi pour arrêter l'infection est relativement tardif par rapport à la durée théorique du cycle d'HSV-1 afin de pouvoir évaluer le comportement des gènes  $\gamma$ .

Les figures 26 et 26 bis représentent une même expérience, réalisée deux fois indépendamment, sur les cellules Huh7 infectées à haute multiplicité. Le virus D30EBA promUS3 Luc n'est pas inclus dans cette expérience. Ces deux expériences montrent clairement que seuls les promoteurs hCMV, 9xHRE en présence de DFO, et AFP (bien que très faiblement) expriment la luciférase dans le contexte du virus D30EBA, c'est à dire, en absence d'ICP4 et peuvent, de ce fait, être considérés comme des promoteurs de type  $\alpha$  (je reviendrai plus bas sur le promoteur 9xHRE).

En revanche, les promoteurs ADH6, ANGPTL3, E2F1, et 9xHRE en absence de DFO, ne s'expriment pas dans un contexte D30EBA mais ils s'expriment dans un contexte Cgal+. Autrement dit, ils ne se comportent pas comme des promoteurs  $\alpha$  car ils ont besoin d'ICP4 pour s'exprimer. De plus, lorsqu'ils sont exprimés à partir du génome Cgal+, ces promoteurs montrent des activités luciférase très similaires en absence ou en présence de PAA. Ils ne dépendent donc pas de la synthèse d'ADN viral pour s'exprimer et peuvent, de ce fait, être considérés comme des promoteurs de type  $\beta$ . Avec quelques variations quantitatives peu significatives, les figures 26 et 26 bis montrent des résultats très proches. La conclusion qui s'impose est que, au moins dans les cellules Huh7 infectées à haute multiplicité, les promoteurs HCC spécifiques ADH6 et ANGPTL3 se comportent comme des gènes  $\beta$  (tout comme E2F1), alors que AFP se comporte plutôt comme un gène  $\alpha$  (\*\*\*) figure 26). La présence d'une différence faible mais significative (\*) entre les valeurs avec et sans PAA pour les promoteurs ADH6 et E2F1 suggère que

ces promoteurs ont tendance à se comporter comme des promoteurs  $\gamma$  ou tout au moins que la quantité de luciférase exprimée bénéficie de la réplication de l'ADN. De manière intéressante, le promoteur 9xHRE est de type  $\beta$  en absence de DFO mais s'active très fortement en présence de DFO, comme si la molécule DFO pouvait se substituer au transactivateur ICP4.

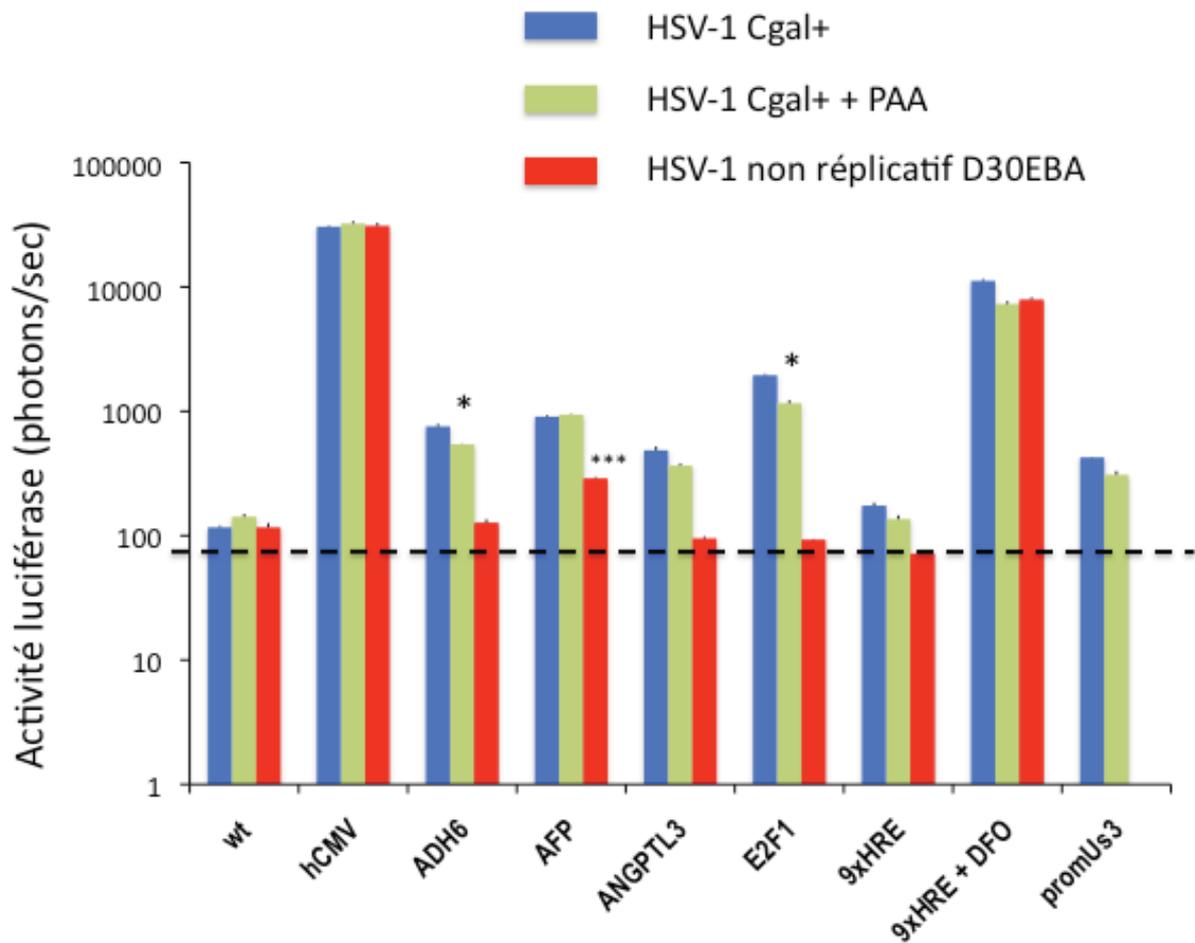


Figure 26 : Etude de la dépendance des promoteurs cellulaires vis à vis d'HSV-1. Tests luciférase réalisés sur  $5 \cdot 10^4$  cellules Huh7 à 18 hpi. Les valeurs luciférase ne sont pas corrigées par les valeurs  $\beta$ -gal. La ligne en points tillés noire représente l'activité basale en absence d'expression luciférase. La valeur HSV-1 ADH6+PAA est significativement différente de HSV-1 ADH6 (\*). Idem pour E2F1 (\*). Activité significative du promoteur AFP dans le génome D30EBA. Pour tous les autres virus, il n'y a pas de différences significatives entre avec ou sans PAA et entre leur valeur d'activité luciférase dans D30EBA et la valeur basale de luminescence (wt).

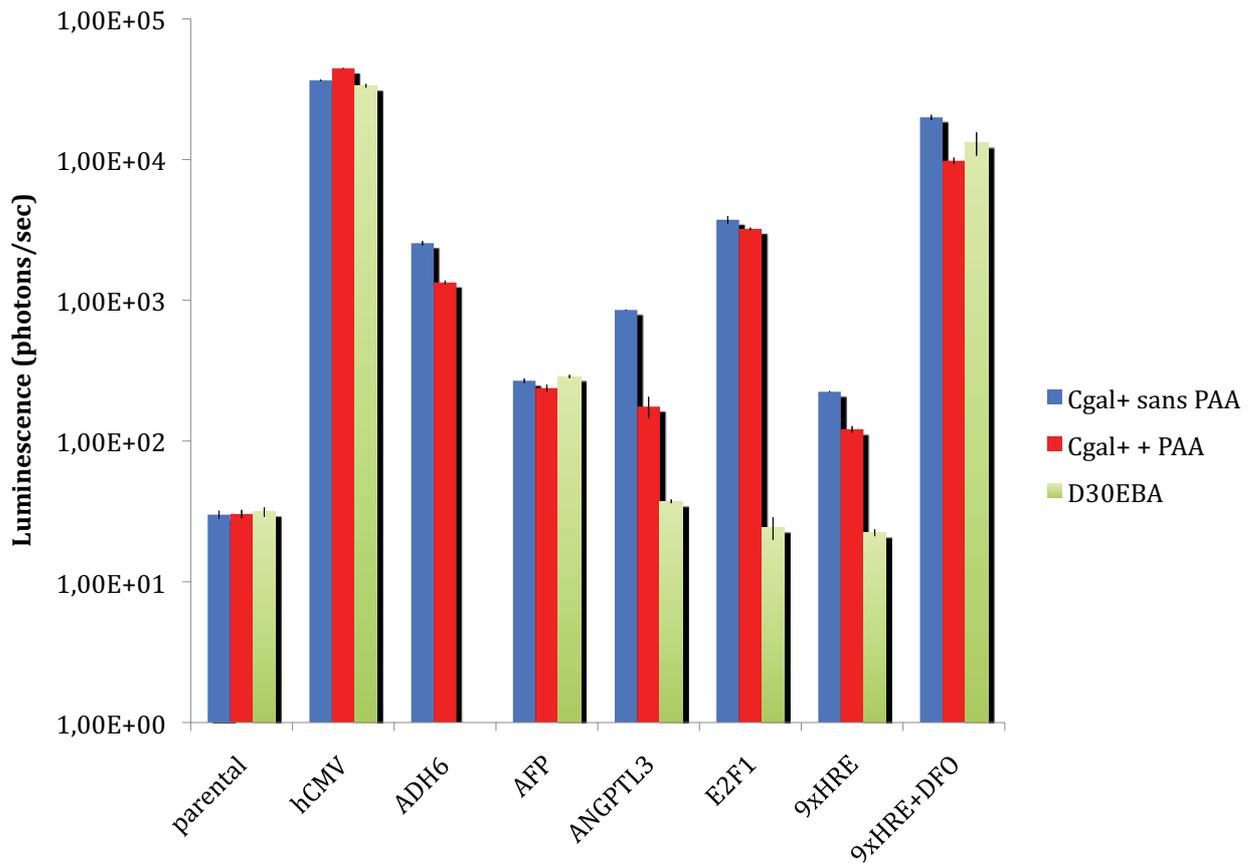


Figure 26 bis : Etude de la dépendance des promoteurs cellulaires vis à vis d'HSV-1. Tests luciférase réalisés sur  $4.10^4$  cellules Huh7 à 20hpi. Les valeurs luciférase ne sont pas corrigées par les valeurs  $\beta$ -gal. Le virus D30EBA ADH6 Luc n'est pas représenté.

Enfin, dans la figure 27, les résultats de la figure 26 sont normalisés par les valeurs de  $\beta$ -gal exprimée sous contrôle du promoteur hCMV, dans tous les virus dérivés de Cgal+ afin de comparer l'activité avec et sans PAA. On peut observer que les résultats ne changent pas d'un point de vue qualitatif, par rapport à la figure 26. Pour chaque virus, il n'y a pas ou plus de différence significative de l'activité promotrice en absence ou présence de PAA. Par conséquent, les promoteurs étudiés se comportent comme des promoteurs de type  $\beta$  qd ils ne se comportent pas comme des promoteurs  $\alpha$  (AFP et 9xHRE + DFO).

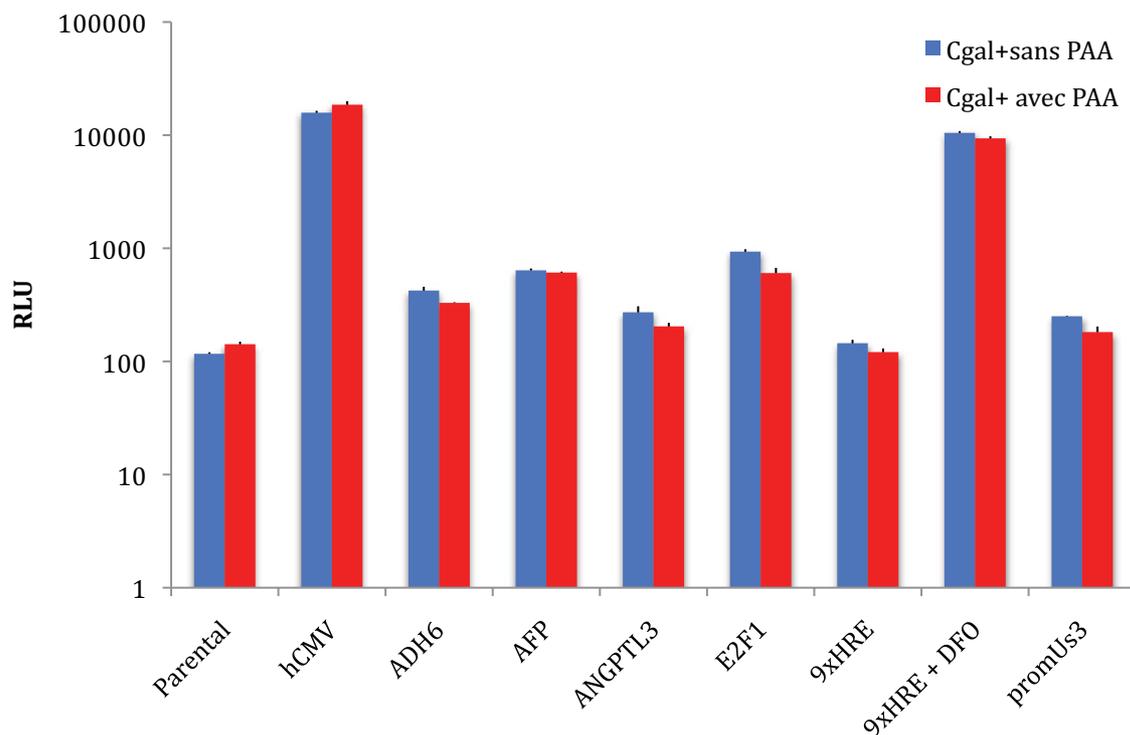


Figure 27 : Etude de la dépendance des promoteurs cellulaires vis à vis d'HSV-1. Tests luciférase réalisés sur cellules Huh7 à 18hpi et correspondant à l'expérience de la Fig. 26. Les valeurs luciférase sont ici corrigées par les valeurs  $\beta$ -gal.

Dans le tableau 5 nous avons comparé les activités luciférase mesurées en présence ou en absence de PAA, de la figure 27, et exprimés comme le rapport entre ces deux valeurs. Les valeurs luciférase semblables, avec et sans PAA, confirment que ces promoteurs sont de type  $\beta$  mais également que les promoteurs actifs sont ceux des génomes entrant et non ceux des génomes produits suite à la réplication de l'ADN. L'activité luciférase dans ces conditions est un marqueur de l'infection et non de la réplication.

Lorsque j'ai réalisé ces mêmes expériences dans les cellules WRL68 (hepatocyte-like), en utilisant les virus recombinants de souche Cgal+, l'activité luciférase observée est très faible avec l'ensemble des promoteurs, excepté hCMV, tant en présence qu'en absence de PAA. Seuls les promoteurs E2F1, 9xHRE en présence de DFO, et éventuellement AFP, montrent une activité faible mais significative par rapport aux cellules infectées par le virus Parental contrôle (figure 28). Dans cette expérience, les promoteurs ANGPTL3 et ADH6 n'ont montré aucune expression dans les cellules WLR68. Nous avons conclu que

l'activité de ces promoteurs est très faible sur les cellules WRL68 et n'avons donc pas testé les virus dérivés de la souche D30EA.

	Sans PAA/PAA
hCMV	0,9
ADH6	1,4
AFP	1,2
ANGPTL3	1,5
E2F1	1,7
9xHRE	1,3
9xHRE + DFO	1,2
promUs3	1,5

Tableau 5 : Rapport des activités luciférase mesurées sans et avec PAA pour chaque promoteur dans la figure 27.

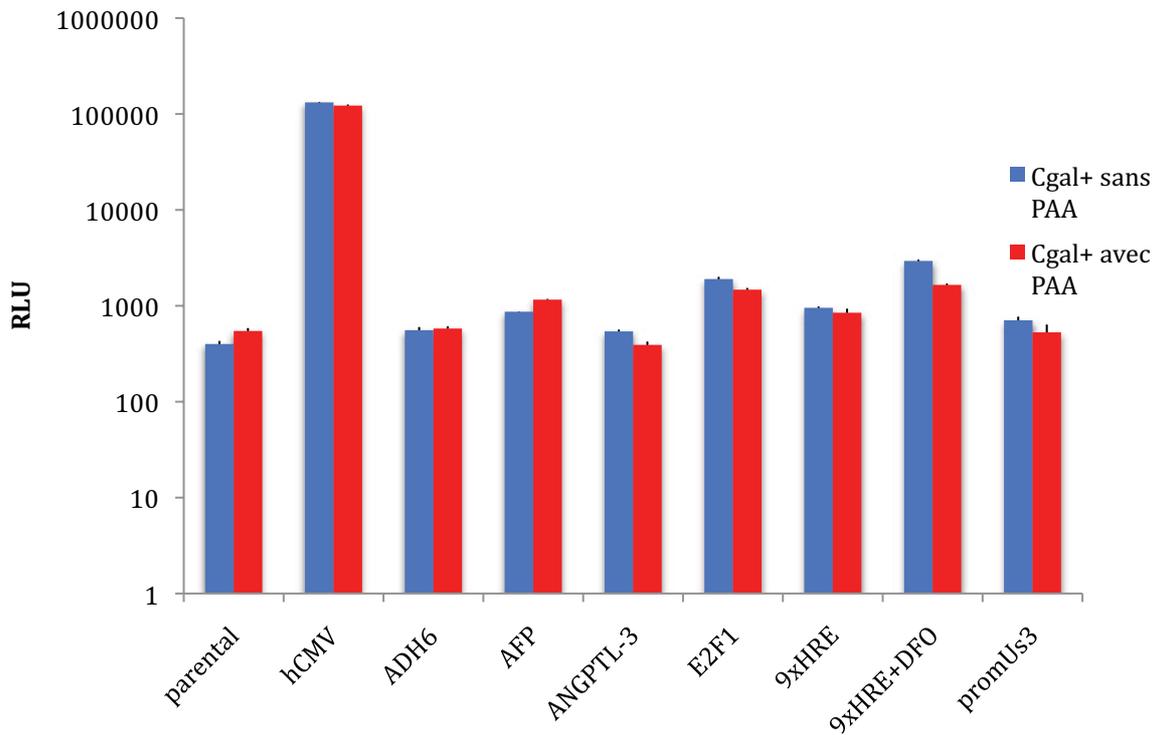


Figure 28 : Etude de la dépendance des promoteurs cellulaires vis à vis d'HSV-1. Tests luciférase réalisés sur cellules WRL68 à 18hpi et correspondant. Les valeurs luciférase sont corrigées par les valeurs  $\beta$ -gal.

### c. Comparaison de l'activité des promoteurs dans les cellules Huh7 et dans les hépatocytes primaires humains.

Les expériences décrites dans les paragraphes précédents ont été réalisées dans des cellules Huh7 ou WRL68, mais à des temps d'infection différents, et avaient surtout pour nous valeur de mise au point, avant de réaliser des expériences comparatives sur des hépatocytes humains frais. Dans les expériences décrites dans les figures 29 et 30 (comparaison directe entre cellules Huh7 et hépatocytes infectées par les recombinants de souche Cgal+), les valeurs ont été normalisées entre les deux types cellulaires en tenant du nombre de cellules. Les cellules ont été infectées à haute multiplicité (m.o.i. 5) et les infections ont été arrêtées à deux temps différents, 10hpi et 20hpi.

On observe que tous les promoteurs étudiés sont plus actifs dans les cellules Huh7 que dans les hépatocytes aux deux temps étudiés, bien que les activités différentielles soient plus significatives à 20hpi. Cette activité différentielle a été mise en évidence de manière quantitative en calculant le rapport de l'activité luciférase dans les Huh7 et dans les hépatocytes (tableaux 6 et 7). A 10hpi, l'activité est faible dans les hépatocytes pour la plupart des promoteurs.

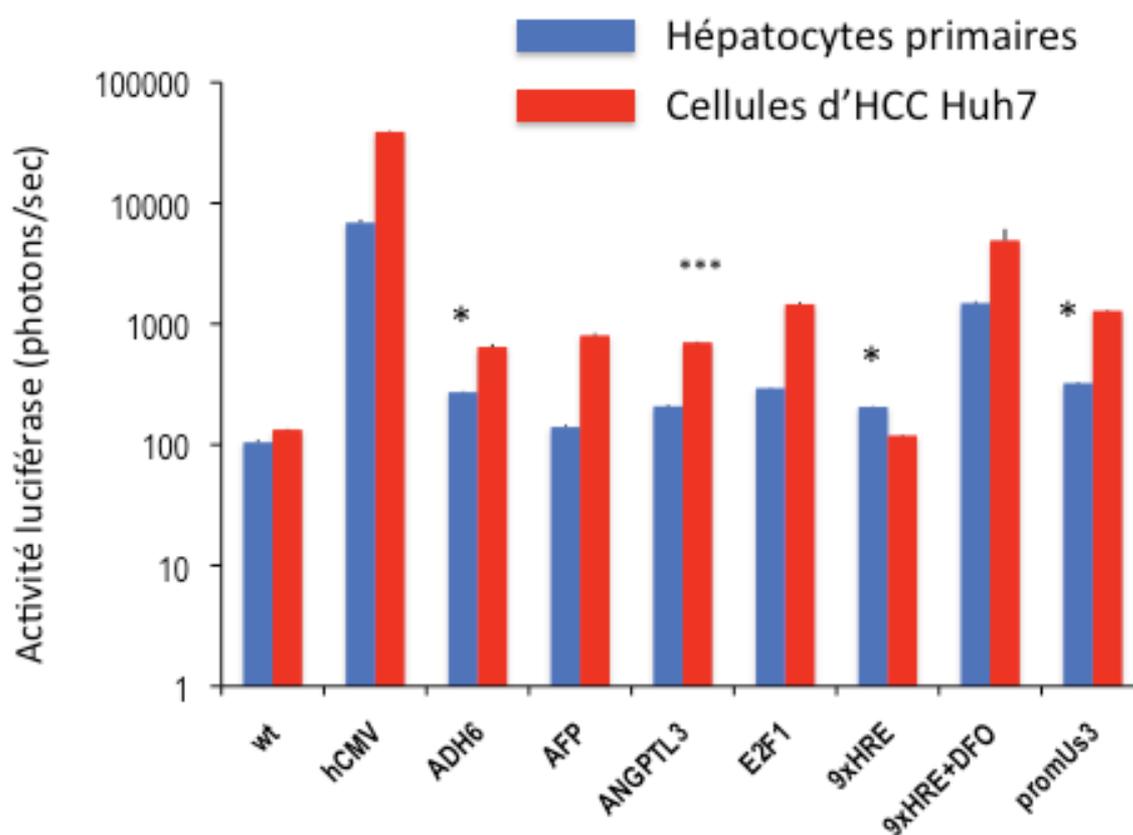


Figure 29 : Evaluation de la spécificité HCC des différents promoteurs. Tests luciférase réalisés sur  $4 \cdot 10^4$  cellules d'hépatocytes primaires ou Huh7 infectées à 5 pfu/cellule. Les infections sont arrêtées à 10hpi. Contrairement à tous les autres virus (\*), les valeurs luciférase des virus ANGPTL3 et AFP ne sont pas différentes du taux basal dans les hépatocytes

wt IGR20	Huh7	Hépatocytes	Rapport
hCMV	39017	6909	5,6
ADH6	643	272	2,4
AFP	802	140	5,7
ANGPTL3	703	208	3,4
E2F1	1458	294	5,0
9xHRE	119	205	0,6
9xHRE+DFO	4914	1489	3,3
promUs3	1283	323	4,0

Tableau 6 : Rapport des activités luciférase sur Huh7 et hépatocytes humains primaires humains pour chaque promoteur, présentés dans la figure 29.

A 20hpi, les promoteurs plus intéressants en terme de ciblage des HCC seraient donc les promoteurs AFP, ANGPTL3, et 9xHRE+DFO (tableau 7).

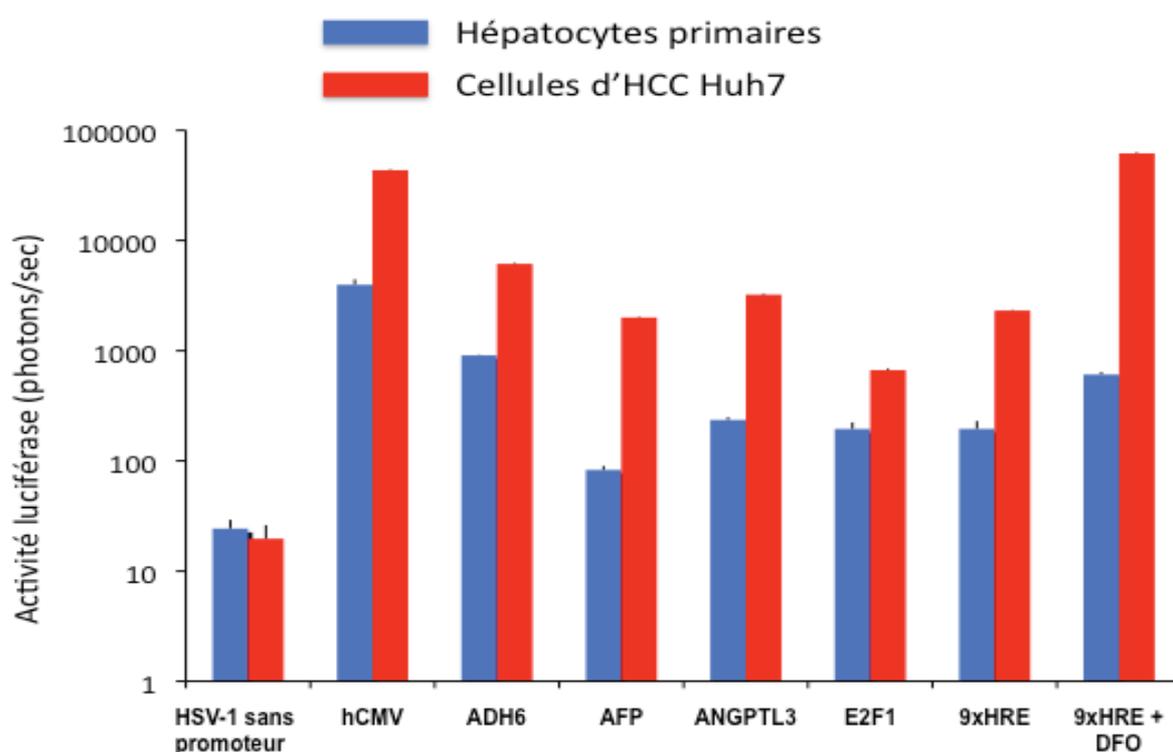


Figure 30 : Evaluation de la spécificité HCC des différents promoteurs. Tests luciférase réalisés à 20hpi à partir de  $5 \cdot 10^4$  cellules d'hépatocytes primaires ou d'Huh7 infectés avec une m.o.i. 5.

wt IGR20	Huh7	Hépatocytes	Rapport
hCMV	43510	3970	11
ADH6	6137	908	7
AFP	2003	83	24
ANGPTL3	3223	236	14
E2F1	665	195	3
9xHRE	2310	195	12
9xHRE DFO	61812	609	102

Tableau 7 : Rapport des activités luciférase sur Huh7 et Hépatocytes primaires humains pour chaque promoteur présenté dans la figure 30.

Les valeurs des tableaux 6 et 7 peuvent être comparées aux valeurs d'activité transcriptionnelle différentielles tel que proposé par UniGene dans le tableau 2. Ainsi l'ordre d'activation différentiel décroissant est respecté entre ces deux études pour les promoteurs AFP, ANGPTL3 et ADH6. Le rapport TPM d'E2F1 est semblable à son ratio d'activité luciférase à 10 hpi mais pas à 20 hpi, suggérant une activité courte de ce promoteur durant le cycle viral d'HSV-1.

Enfin, pour tester le potentiel de ciblage des promoteurs, j'ai entrepris une étude préliminaire sur un large panel de types cellulaires. J'ai simultanément infecté pendant 8 heures à m.o.i. 5 les deux lignées d'hépatome (Huh7 et Hep3B), une lignée d'hépatoblastome (HepG2), deux lignées cellulaires dérivés de cancers non hépatiques (HeLa et Gli36), et deux lignées cellulaires établies d'origine hépatique (WRL68 et HepaRG). Les données sont présentées après une normalisation simple du nombre de cellules (figure 31). La comparaison entre types cellulaires sur la base du nombre de cellules, ne tient pas compte de la permissivité propre à chaque type cellulaire (voir commentaires de la figure 16). Ces résultats préliminaires permettent néanmoins de noter que les promoteurs AFP et ANGPTL3 sont spécifiquement actifs dans les HCC et ces deux promoteurs ont des activités comparables. Ces promoteurs ne s'expriment que très faiblement sur les autres types cellulaires, cancéreux ou pas. La lignée HepG2 semble d'ailleurs être la lignée permettant la plus forte expression, de manière semblable pour ces deux promoteurs. La lignée HepG2 est une lignée d'hépatoblastome, un cancer du foie issu d'hépatoblastes et apparaissant après la naissance. D'autres promoteurs, comme E2F1, hTERT ou HRE s'expriment de manière relativement faible dans les cellules WRL68 et HepaRG, mais beaucoup plus intensément sur les autres cellules cancéreuses, indiquant qu'ils ne sont pas spécifiques d'HCC.

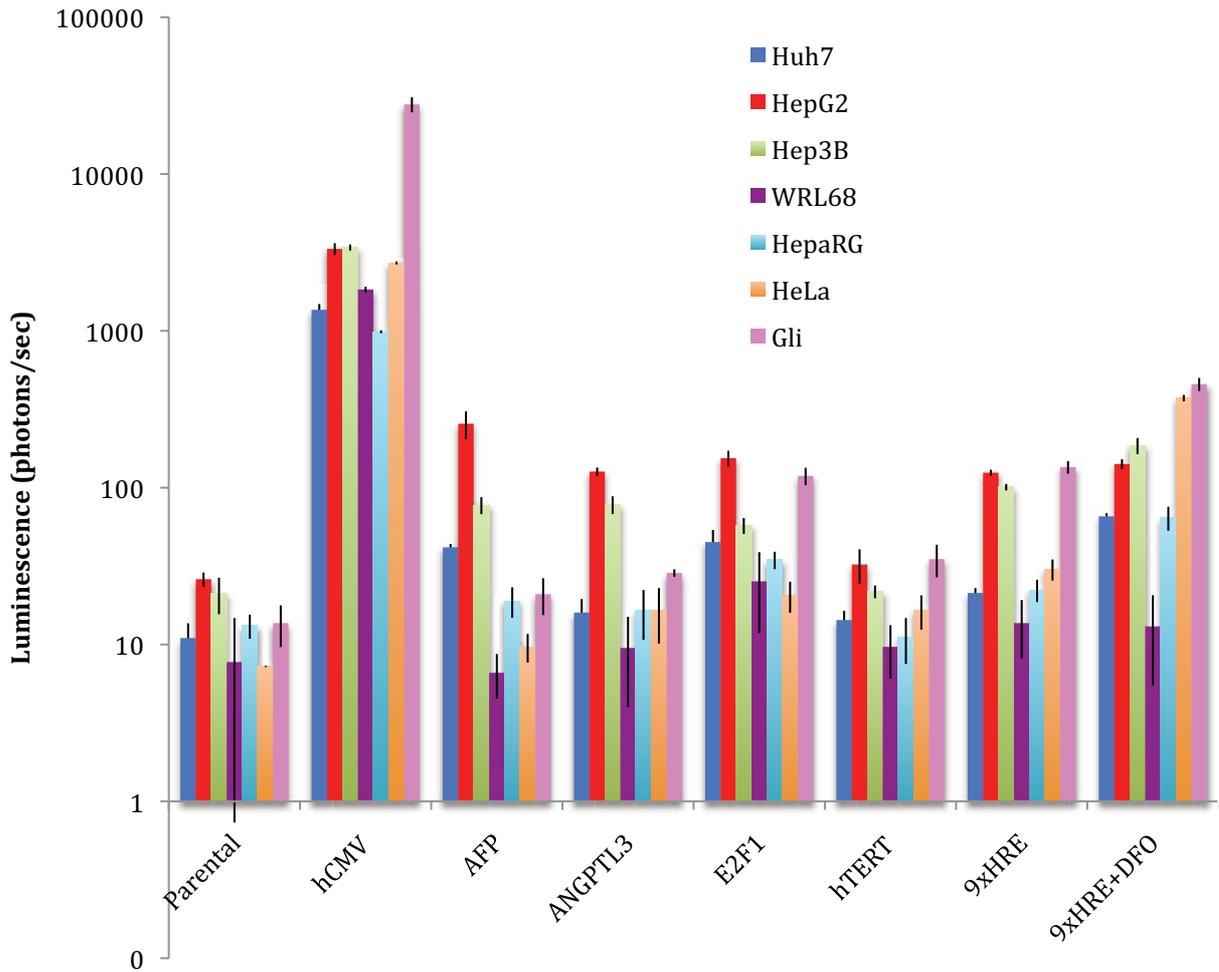


Figure 31 : Comparaison de l'activité luciférase sous contrôle des différents promoteurs dans différents types cellulaires après infection pendant 8 heures à une m.o.i. 5 avec les recombinants Cgal+. Les valeurs sont normalisées par rapport au nombre de cellules.

### 3. Etude in vivo des promoteurs de ciblage

Pour compléter l'étude des promoteurs, quelques expériences ont été menées sur un modèle de tumeur Huh7 implantées sur souris athymiques, en collaboration avec l'équipe du Dr. Ruben Hernandez-Alcoceba de l'Université de Navarra, à Pampluna (Espagne). Avec ces études in vivo, on a cherché à démontrer la spécificité du promoteur pour les tissus HCC et de tester son inactivité dans les tissus sains de l'organisme que l'infection peut atteindre. Ces expériences ont été de nouveau réalisées et sont présentées dans l'article en annexe. Dans cet article, la figure 5 reprend le protocole de la figure 34 et ajoute les images permettant de suivre l'activité des promoteurs dans les tumeurs sous cutanées Huh7. La figure 6 de l'article en annexe montre ces deux expériences sur des souris immunocompétentes greffées avec une tumeur HCC syngénique. Les résultats sont similaires à ceux de la figure 5 de l'article en annexe.

Dans l'expérience de la figure 32, le promoteur hCMV est anormalement faible en regard des résultats obtenus in vitro et dans d'autres expériences in vivo. On peut considérer que l'infection par le virus Cgal+ hCMV Luc dans cette expérience n'a donc pas été effective. L'évolution des moyennes d'activité pour les autres promoteurs montre un schéma d'expression similaire à celui de la figure 24, pour les promoteurs ANGPTL3 et 9xHRE.

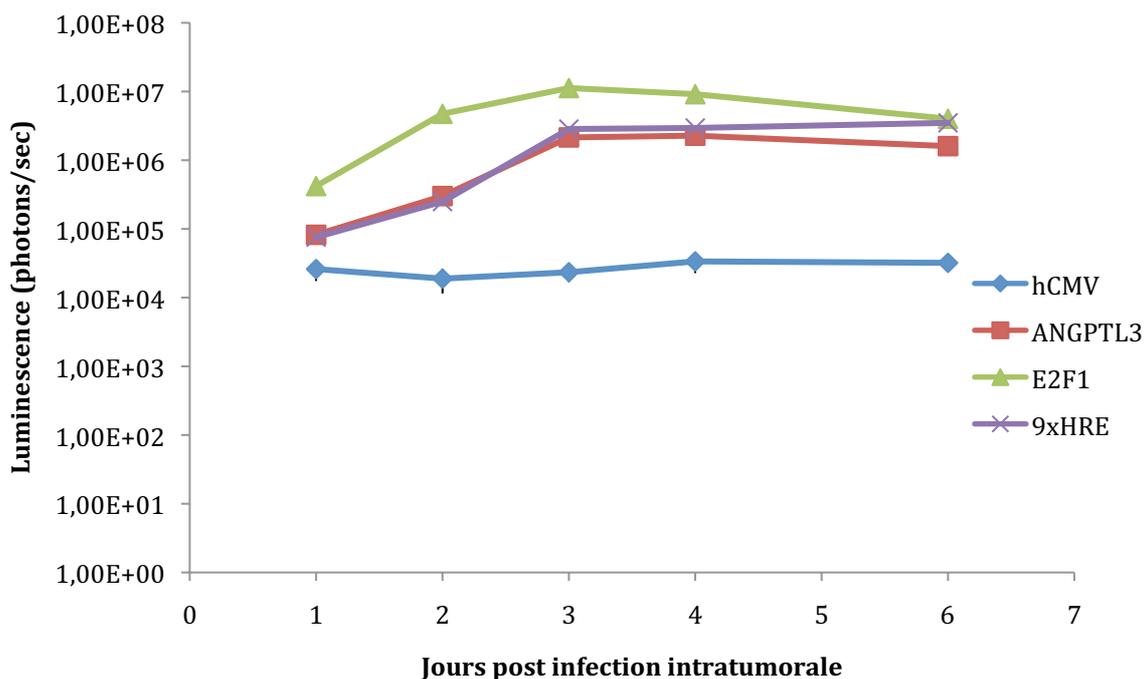


Figure 32 : Comparaison de l'activité des promoteurs hCMV, E2F1, ANGPTL3 et 9xHRE sur un modèle de xénogreffe d'HCC humains sur souris nude. Tests luciférase réalisés sur souris athymiques à différents jours post infection. Les tumeurs Huh7 sous-cutanées sont injectées avec  $10^5$  pfu de virus Cgal+ prom Luc. Chaque point est une moyenne des résultats obtenus sur 5 animaux.

Cette expérience a été reconduite (figure 33) et confirme une activité stable des quatre promoteurs jusqu'à 15 jours post infection. Le promoteur hCMV montre la plus forte activité, dans le tissu tumoral et dans le foie. L'analyse des résultats concernant l'activité des promoteurs dans le tissu hépatique murin doit tenir compte du fait qu'il s'agit de promoteurs humains et que la permissivité des hépatocytes murins à l'infection HSV-1 peut ne pas être la même que celle des hépatocytes humains. Néanmoins, comme on l'a vu précédemment, l'activité luciférase sur une longue période de temps (supérieure à un cycle) est un marqueur de la réplication virale. Ainsi, le virus Cgal+ hCMV Luc, d'après son activité luciférase croissante dans le foie, est susceptible de s'y multiplier. Par conséquent, les résultats montrent que sa différence d'activité entre le foie et la tumeur Huh7, importante au début, s'amenuise avec le temps. Néanmoins, il faut préciser que les sites d'infection hépatiques et tumoraux sont différents. La réception de photons émis depuis le foie est atténuée par les tissus de la paroi abdominale. Ce qui n'est pas le cas pour les tumeurs en position sous cutanée. L'activité différentielle est nettement plus importante pour les 3 autres promoteurs et, surtout, elle reste constante et très faible dans le foie, suggérant que ces promoteurs ne s'expriment pas dans le tissu hépatique, malgré la multiplication virale.

La perte d'activité à 3 jours post infection dans le foie pour le virus Cgal+ hCMV Luc est interprétée comme la conséquence de la clairance hépatique, qui est une des principales barrières à l'infection oncolytique par voie systémique, mais également un moyen de protection du tissu hépatique. Cette supposition devra être confirmée par des tests de cytotoxicité hépatique.

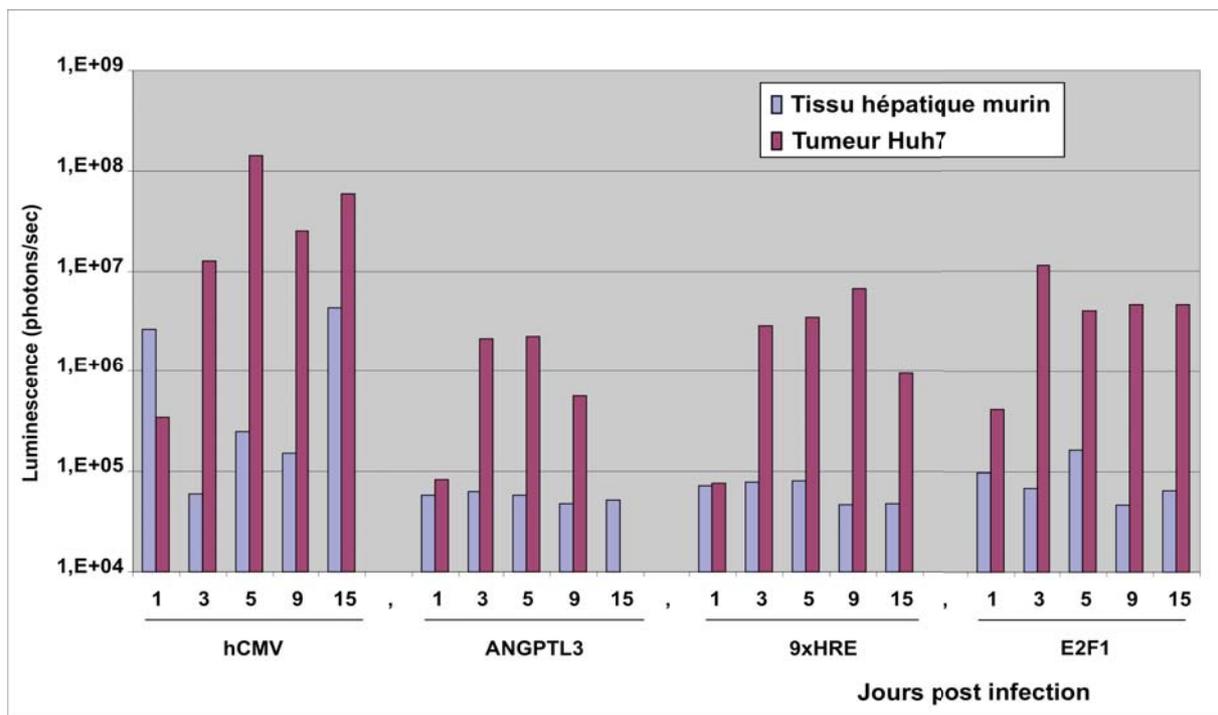


Figure 33 : Activité des promoteurs hCMV, E2F1, ANGPTL3 et 9xHRE dans des xénogreffes de tumeurs d'HCC humains ou dans le foie de souris nudes. Injection intrahépatique de  $2.10^5$  pfu ou intratumorale de  $10^5$  pfu de virus recombinants Cgal+ exprimant la luciférase sous contrôle des promoteurs hCMV, ANGPTL3, E2F1, et 9xHRE.

La figure 34 présente l'activité luciférase in situ. On observe avec le virus Cgal+ hCMV Luc que l'activité luciférase réapparaît après la diminution à 3 jours post infection. Tous les animaux infectés meurent des suites neurologiques de l'infection HSV-1, quelque soit le virus recombinant Cgal+ injecté. Cependant à aucun moment on ne voit une activité luciférase exprimée par les virus recombinants contenant Luc sous contrôle des promoteurs ANGPTL3, E2F1 ou 9xHRE. L'activité luciférase captée par une caméra à photon permet une résolution au niveau tissulaire d'environ 50 000 cellules.

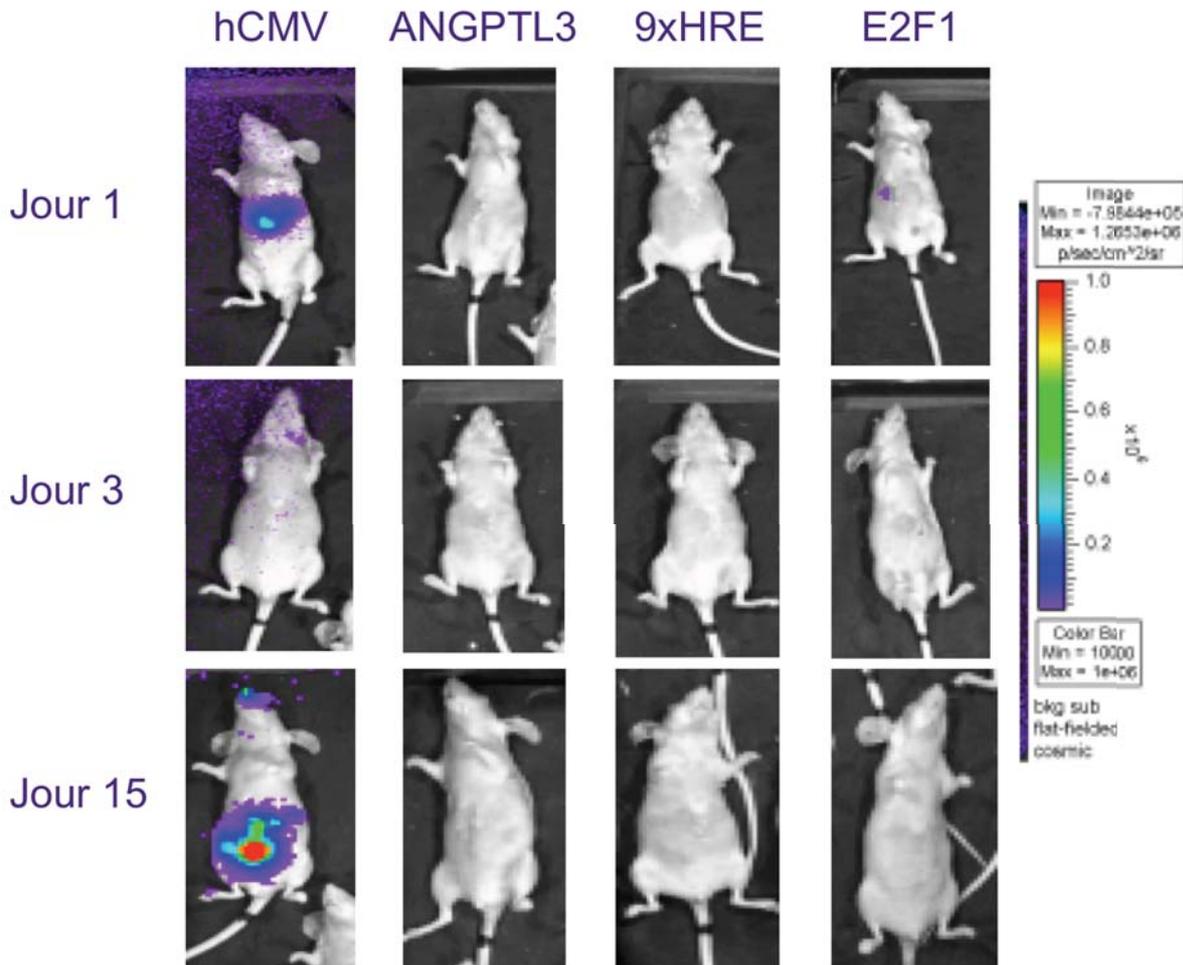


Figure 34 : Activité luciférase in vivo des promoteurs hCMV, E2F1, ANGPTL3 et 9xHRE. Injection intrahépatique de  $2 \cdot 10^5$  pfu de virus recombinants Cgal+ exprimant la luciférase sous contrôle des promoteurs hCMV, ANGPTL3, E2F1 et 9xHRE.

En conclusion, l'émission de photon dans la durée et sur une large zone, bien visible dans le cas d'HSV-1, démontre la multiplication des virus recombinants HSV-1 et leur aptitude à se propager dans un tissu. Ce faisant, ces expériences ont démontré la spécificité du promoteur ANGPTL3 pour les tissus de HCC. Bien qu'il s'agisse de tissus murins, la non-activité de ce promoteur dans les tissus sains de l'animal, mise en évidence par l'absence de photons, est une donnée encourageante pour son utilisation en virothérapie oncolytique

#### **4. Conclusions de l'étude des promoteurs de ciblage**

En conclusion, nous avons dans cette étude identifié par une recherche bibliographique un certain nombre de promoteurs spécifiques d'HCC, et nous avons confirmé qu'ils s'expriment de manière différentielle dans les cellules d'hépatome, même lorsqu'ils s'expriment à partir du génome HSV-1.

J'ai construit plusieurs virus recombinants, exprimant la luciférase sous contrôle de promoteurs HCC-spécifiques ou cancer-spécifique. L'utilisation du système rapporteur luciférase a permis de caractériser de manière quantitative la cinétique, la force et la spécificité de ces promoteurs dans le génome HSV-1. Dans le but de cibler le gène viral Us3, ces promoteurs cellulaires ont été comparés au promoteur viral Us3. Une nouvelle caractéristique a été établie pour ces promoteurs cellulaires en montrant leur degré de dépendance vis à vis d'HSV-1. Ces résultats m'ont permis de montrer que la plupart de ces promoteurs ont une cinétique virale de type  $\beta$ . L'objectif de rationaliser l'étape du choix du promoteur dans la construction de virus oncolytiques ciblés s'appuie sur l'ensemble de ces données pour permettre à terme d'identifier des éléments de décision dans le choix d'un promoteur cellulaire en fonction du gène viral à cibler.

De l'ensemble de mes résultats, je conclus que plusieurs promoteurs montrent des activités, parfois faibles, mais spécifiques des cellules d'HCC, tant à faible qu'à haute multiplicité d'expression, en culture de cellule que chez des souris athymiques. Au terme de cette évaluation, nous avons décidé d'utiliser deux de ces promoteurs, les promoteurs ANGPTL3 et 9xHRE, pour cibler l'expression de la protéine Us3, ce qui sera développé dans le chapitre suivant.

## **IV. Virus oncolytiques ciblant l'expression de la protéine virale Us3.**

Nous avons choisi de cibler le gène codant pour la protéine Us3 d'HSV-1. Comme nous l'avons déjà mentionné la protéine Us3 est un inhibiteur de la réponse apoptotique induite dans les cellules infectées. L'idée est que, lorsque le gène est mis sous contrôle d'un promoteur spécifique d'HCC, il devrait s'exprimer dans les hépatomes, et la protéine Us3 bloquerait l'apoptose précoce, et permettrait la multiplication et la dissémination du virus dans la masse tumorale. Dans les hépatocytes, en revanche, l'absence ou la faible activité de ce promoteur ne suffiront pas à éviter l'apoptose, et les cellules mourront sans produire le virus. Dans ce chapitre, je décris la construction d'un virus HSV-1 contenant le gène Us3 sous contrôle des promoteurs 9xHRE ou ANGPTL3, ainsi que certaines propriétés de ces recombinants, que nous sommes toujours en train de caractériser.

### **1. Construction des virus oncolytiques**

La construction de ces virus oncolytiques comporte plusieurs étapes. Tout d'abord, l'ORF Us3 a été totalement retirée du génome HSV-1, en utilisant la technique BAC. En effet, il est important que le génome HSV-1 Us3- ne contienne aucune séquence d'Us3 afin d'éviter les recombinaisons homologues illégitimes lors de la réintroduction du gène Us3 sous contrôle des promoteurs cellulaires. La technique de production du virus HSV-1 Us3- est illustrée dans la figure 35. Un plasmide, contenant le gène galK flanqué des séquences homologues aux séquences situées en amont et en aval de l'ORF Us3 est introduit dans des bactéries contenant le génome HSV-1 cloné dans un BAC, et les bactéries recombinantes, c'est à dire capables de pousser dans un milieu sélectif, ont été sélectionnées. Ensuite, la séquence BAC (qui est entourée par deux sites loxP) est éliminée par transfection du génome recombinant dans les cellules de mammifère TE-CRE-Grina, qui expriment la recombinase Cre. Ces cellules produisent le virus HSV-1 Us3-.

Après avoir produit et caractérisé le virus HSV-1 Us3- (voir plus bas), j'ai réintroduit le gène Us3, cette fois sous contrôle des promoteurs ANGPTL3 ou 9xHRE, dans la région IGR20, en suivant la même méthodologie que celle utilisée pour construire les virus Cgal+ prom Luc (voir figure 7). Cette seconde étape a été réalisée donc en deux étapes. J'ai d'abord introduit le gène hCMV GFP dans le locus IGR20 et, après avoir identifié, sélectionné et produit le virus GFP correspondant, j'ai éliminé le gène GFP rapporteur en transfectant les cellules avec les plasmides de recombinaison IGR20 ANGPTL3 Us3 ou IGR20 9xHRE Us3. J'ai ainsi produit une batterie de 4 virus, à savoir : (i) HSV-1 17+, (ii) HSV-1 Us3-, (iii) HSV-1 ANGPTL3 Us3 et (iv) HSV-1 9xHRE US3.

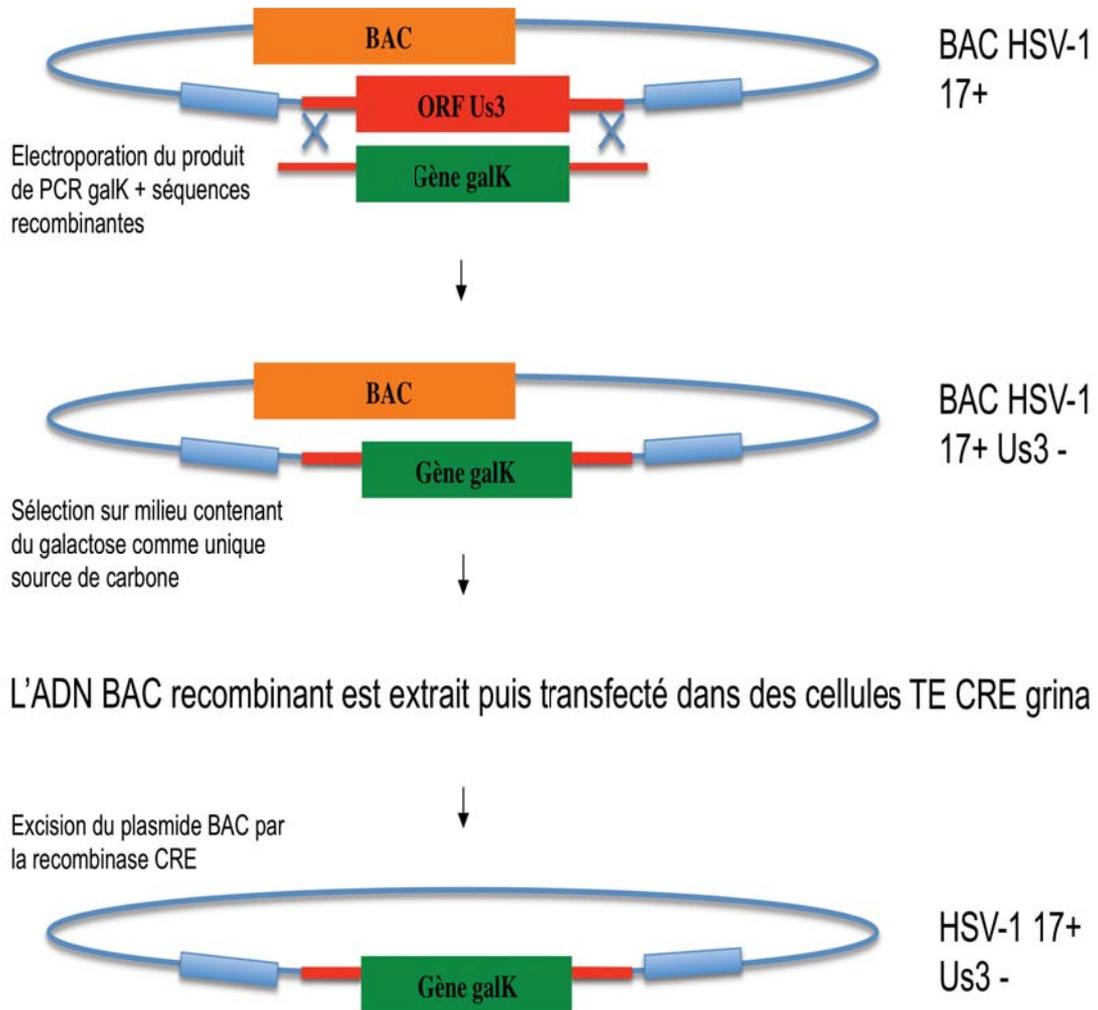


Figure 35 : Schéma de production du virus HSV-1 Us3- par la technique BAC.

## 2. Caractérisation génétique des virus Us3 recombinants

La structure génétique de ces 4 virus a été vérifiée par comparaison de leurs profils de restriction (figure 36) et par des analyses PCR dont les primers ont été choisis de telle sorte qu'ils permettent de différencier les différentes insertions (galK, 9xHRE Us3, ANGPTL3 Us3) ainsi que leur localisation (IGR20, ORF Us3).

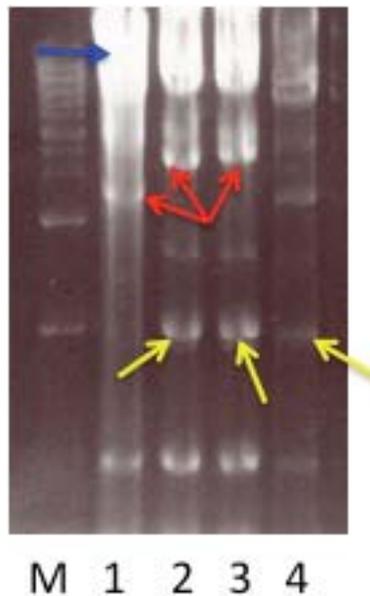


Figure 36 : Profils de restriction des ADN des virus HSV-1 17+ (colonne 1), HSV-1 9xHRE Us3 (colonne 2), HSV-1 ANGPTL3 Us3 (colonne 3) et HSV-1 Us3- (colonne 4). L'ADN viral est digéré par l'enzyme de restriction BstBI puis il est analysé par électrophorèse en gel d'agarose 1%. Le fragment indiqué par la flèche bleue contient l'ORF Us3. Les flèches vertes pointent le nouveau fragment obtenu suite au remplacement de l'ORF Us3 par l'ORF galK (qui contient un site BstBI). Les flèches rouges montrent que la taille du fragment de restriction contenant le locus IGR20 augmente lorsqu'il contient la séquence promUs3 .

### 3. Analyse de l'expression d'Us3 sous contrôle des promoteurs ANGPTL3 ou 9xHRE.

Après avoir confirmé la structure génétique des 4 virus, j'ai vérifié si leurs profils d'expression d'Us3 étaient corrects. Pour cela, j'ai réalisé des Western Blots à partir de cellules Huh7 infectées avec les 4 virus et mis en évidence la présence ou l'absence de la protéine Us3 en utilisant un anticorps spécifique d'Us3 qui nous a été fourni par le Dr. B. Roizman. Le résultat de cette expérience se trouve dans le figure 37. On peut voir dans cette figure que le virus parental HSV-1 17+ exprime bien un doublet de protéines correspondant aux deux formes d'Us3 (en effet, une deuxième protéine, nommé Us3.5, synthétisée à partir d'un ATG interne de l'ARNm, est souvent détecté dans les cellules infectées, voir piste 2). Ce doublet est absent dans les cellules non infectées (piste 1), ainsi que dans les cellules infectées avec le virus délété HSV-1 Us3-, illustrant bien la perte du gène correspondant (piste 5). En revanche, le virus exprimant Us3 sous contrôle du promoteur 9xHRE exprime bien la protéine Us3 (piste 3) et le promoteur 9xHRE est par ailleurs activé par le DFO (piste 4), indiquant que ce promoteur reste inductible dans ce contexte. Dans le cas du promoteur ANGPTL3, nous observons également la présence d'Us3 mais en quantité plus faible.

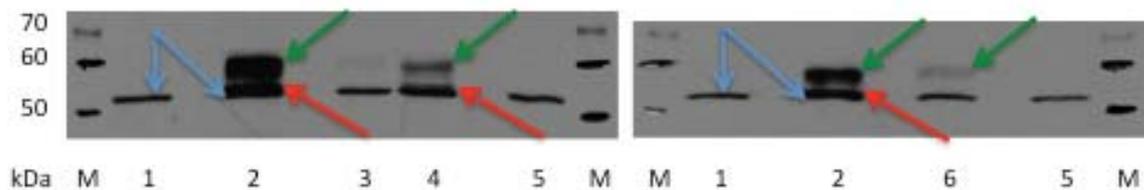


Figure 37 : Western Blot à partir de cellules Huh7 non infectées (1) ou infectées 24h à m.o.i. 5 avec HSV-1 17+(2). HSV-1 9xHRE Us3 (3). HSV-1 9xHRE Us3 + DFO (4). HSV-1 Us3- (5). HSV-1 ANGPTL3 Us3 (6). (M) marqueur de poids moléculaire en kDa. L'anticorps de lapin anti-Us3 met en évidence une bande non-spécifique (flèche bleue) et deux bandes spécifiques des deux formes d'Us3 (flèches vertes et rouges). La flèche rouge correspond à l'isoforme à 52kDa qui est plus documentée de la protéine Us3.

#### 4. Croissance des virus oncolytiques.

Ayant observé que les virus recombinants expriment la protéine Us3, j'ai comparé leurs capacités de multiplication à celle du virus délété HSV-1 Us3-. J'ai infecté des cellules Huh7 et HeLa, en conditions de normoxie, et a faible multiplicité d'infection (m.o.i. 0.02) avec les 4 virus étudiés dans ce chapitre. Les infections sont arrêtées à 4 jours post-infection et le nombre de particules est titré. Les résultats sont montrés dans les figures 38, 39 et 40. On peut voir dans la figure 38 que le virus HSV-1 Us3- produit environ 50 fois moins de particules dans les cellules Huh7 que le virus sauvage HSV-1 17+, soulignant l'importance du gène Us3 pour une bonne multiplication du virus. Le virus recombinant HSV-1 9xHRE Us3 est produit en quantités intermédiaires, indiquant que ce promoteur permet l'expression d'Us3, au moins de manière partielle, et améliore les conditions de multiplication du virus recombinant. La figure 39 présente des résultats similaires sur cellules HeLa.

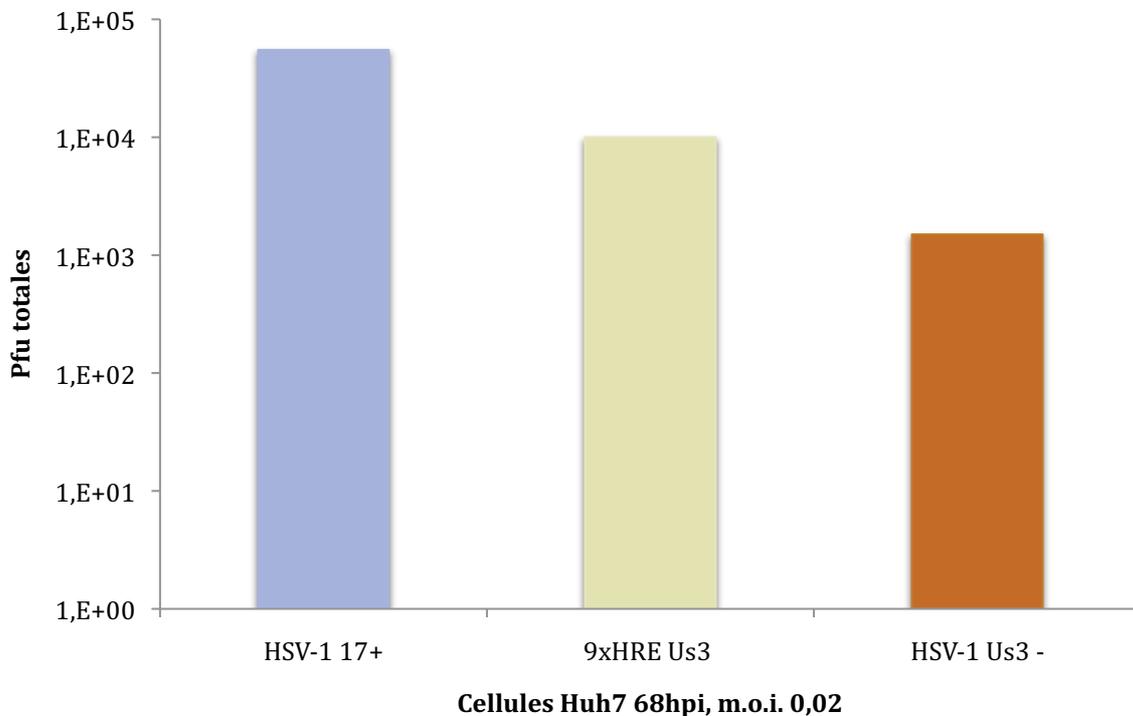


Figure 38 : Comparaison des productions des virus HSV-1 17+, HSV-1 9xHRE Us3 et HSV-1 Us3-. Les cellules Huh7 sont infectées à m.o.i. 0,02. L'infection est arrêtée à 68hpi.

Dans le cas du virus recombinant HSV-1 ANGPTL3 Us3, les résultats obtenus dans des cellules HeLa et Huh7 sont différents. Alors que dans les cellules HeLa, infectées à faible multiplicité par les 3 virus, on observe que le virus HSV-1 ANGPTL3 Us3 se multiplie légèrement mieux que le virus délété Us3- (figure 40), dans les cellules Huh7 on ne voit pas un tel effet compensateur, le virus HSV-1 ANGPTL3 Us3 se multipliant aussi mal, voire moins bien, que le virus délété (figure 41). Nous ne comprenons pas ce résultat surprenant, mais il est possible que la faible activité du promoteur ANGPTL3, déjà observé par Westerns blots, ne suffise pas à permettre une synthèse adéquate d'Us3.

D'autre part, il faut tenir compte du fait que ces expériences n'ont été réalisées qu'une seule fois et doivent par conséquent être considérées comme préliminaires.

Enfin, j'ai infectée des cellules hepatocyte-like WRL68 avec les 4 virus, dans les mêmes conditions que précédemment. Les résultats obtenus de la figure 42 sont similaires à ceux des figures 38 à 41 en ce qui concerne la corrélation entre l'expression différentielle d'Us3 et la production virale. La faible activité du promoteur ANGPTL3, tout comme l'activité basale plus intense du promoteur 9xHRE sur ces cellules, restent néanmoins à confirmer.

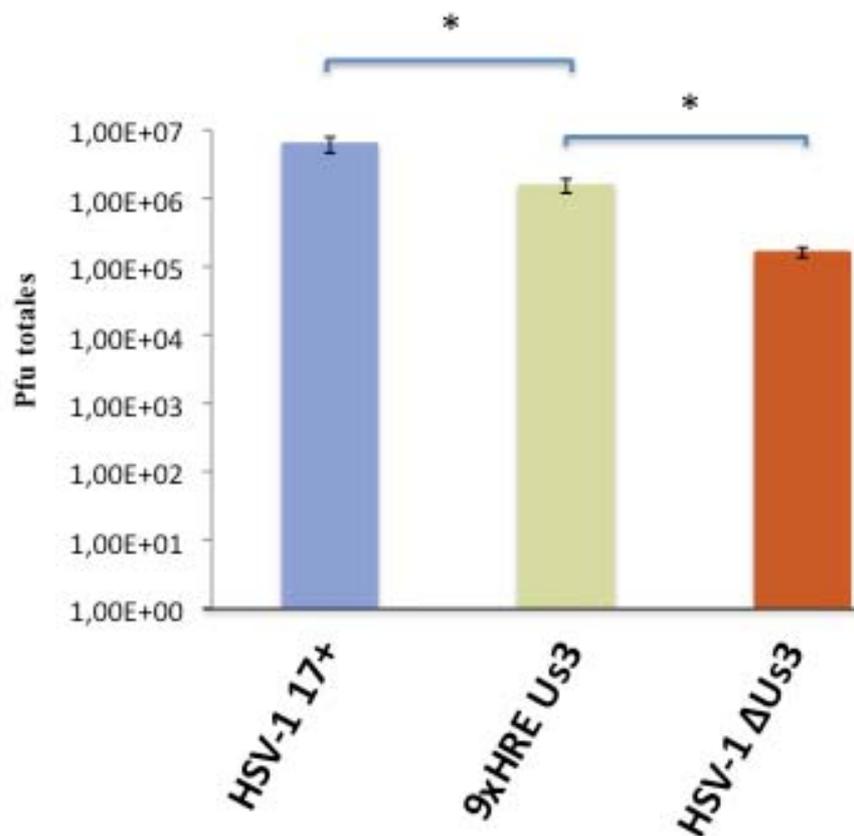


Figure 39 : Comparaison des productions des virus HSV-1 17+, HSV-1 9xHRE Us3 et HSV-1 Us3-. Les cellules HeLa sont infectées à m.o.i. 0,02. L'infection est arrêtée à 70hpi.

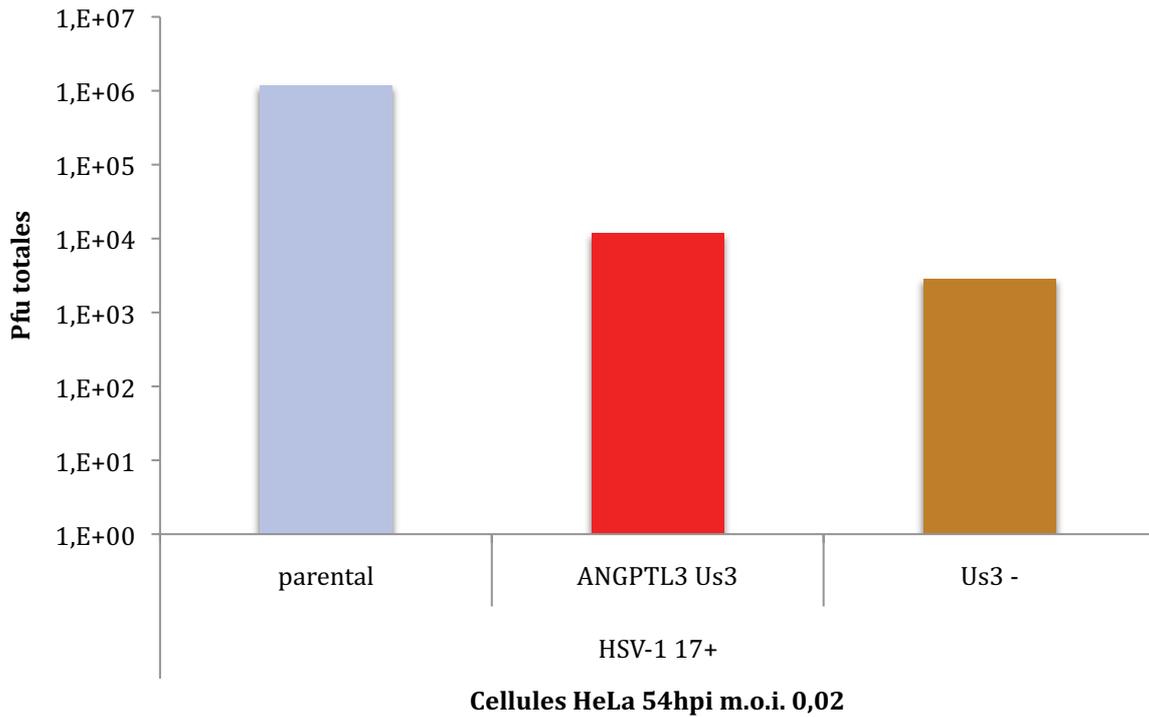


Figure 40 : Production de virus HSV-1 17+, HSV-1 ANGPTL3 Us3 et HSV-1 Us3 -, 54 heures après infection de cellules HeLa à m.o.i. 0,02.

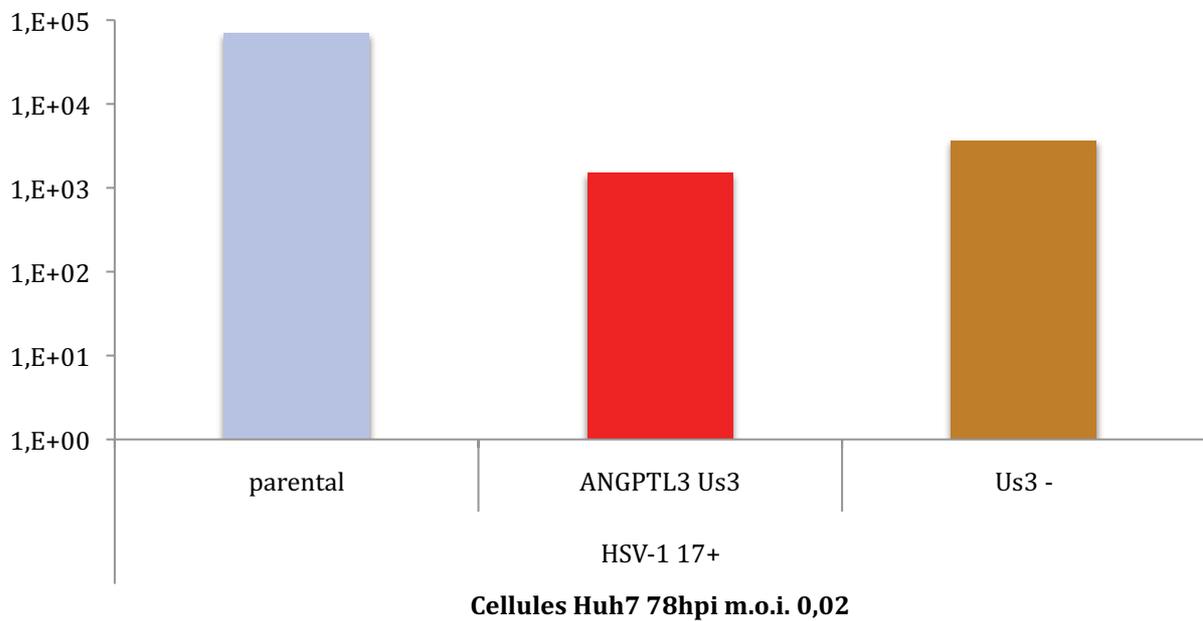


Figure 41 : Production de virus HSV-1 17+, HSV-1 ANGPTL3 Us3 et HSV-1 Us3-, 78 heures après infection de cellules Huh7 à m.o.i. 0,02.

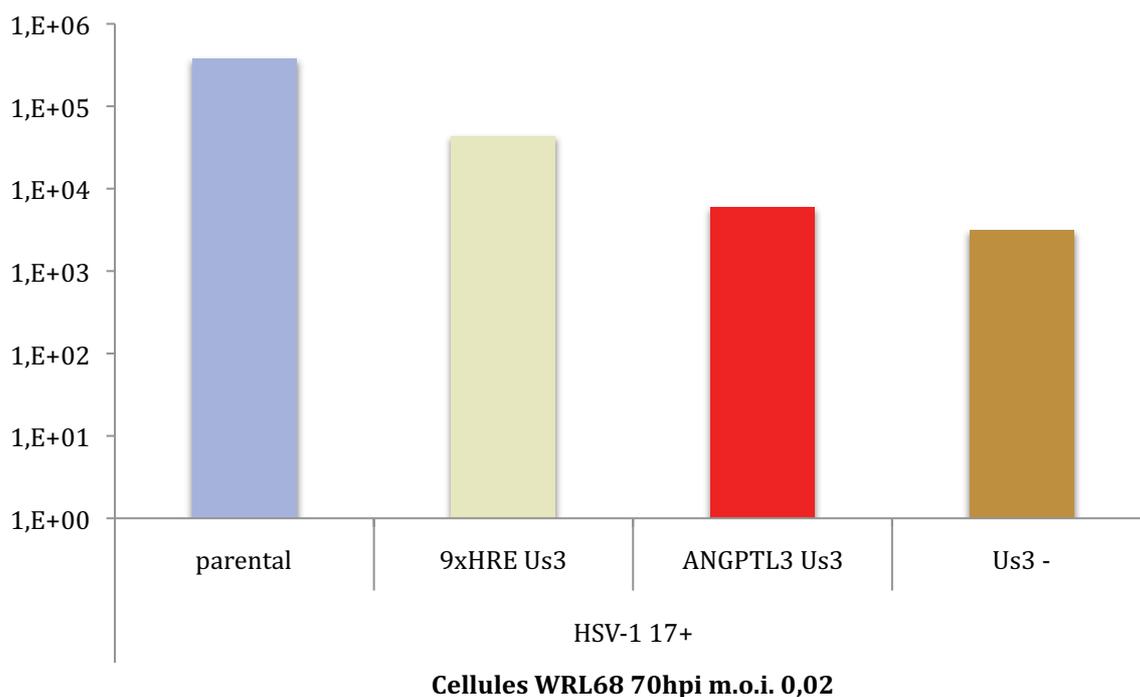


Figure 42 : Production de virus HSV-1 17+, HSV-1 9xHRE Us3, HSV-1 ANGPTL3 Us3 et HSV-1 Us3-, 70 heures après infection de cellules WRL68 à m.o.i. 0,02.

Pour conclure ce chapitre, j'ai construit un virus délété du gène Us3 et deux autres virus recombinants dans lesquels le gène Us3 a été ensuite réintroduit dans la région IGR20 du génome viral, soit sous contrôle du promoteur 9xHRE, soit sous contrôle du promoteur ANGPTL3. Ces virus ont été produits et leur structure génétique a été validée par des analyses de profils de restriction et par des PCR réalisées à partir des 3 génomes. Des analyses de Western blots ont confirmées qu'il n'y a pas d'expression d'Us3 avec le virus délété et que Us3 est exprimée mais de manière différentielle à partir des deux virus recombinants. L'expression est considérablement plus intense avec le promoteur 9xHRE en présence de DFO et très faible, mais visible, en son absence, montrant que ce virus permet d'exprimer la protéine US3 de manière inductible. Le recombinant exprimant Us3 sous contrôle du promoteur ANGPTL3 s'exprime faiblement dans les cellules Huh7.

Enfin, j'ai commencé d'étudier si l'expression d'Us3 sous contrôle de ces promoteurs permet de rétablir un niveau de multiplication du virus similaire à celle du virus parental HSV-1 17+. Le virus délété HSV-1 Us3- se multiplie en effet beaucoup moins bien (près de 100 fois moins) quelque soit le type cellulaire infecté. Le virus HSV-1 9xHRE Us3 montre des niveaux de production intermédiaires dans cellules HeLa, Huh7, et WRL68 infectées à faible multiplicité d'infection et en absence de DFO, montrant que cette expression d'Us3, même faible, permet de rétablir au moins partiellement la multiplication du virus délété. Les résultats obtenus avec le virus HSV-1 ANGPTL3 Us3 sont pour l'instant négatifs, l'expression d'Us3 sous contrôle du promoteur spécifique d'HCC ne permettant pas d'augmenter significativement la multiplication virale. Ces

résultats restent néanmoins à confirmer car les expériences n'ont été réalisées qu'une seule fois.

Ce chapitre n'est donc pas encore terminé, mais j'ai construit des virus qui me permettront de tester nos hypothèses de ciblage. Je suis actuellement, en train de mettre au point des tests d'inhibition de l'apoptose, ainsi que des tests nous permettant d'évaluer la multiplication de ces virus dans les conditions adéquates. En particulier, le virus HSV-1 9xHRE Us3 doit être évalué dans de vraies conditions d'hypoxie et pas seulement sous DFO qui, comme nous l'avons vu précédemment, interfère avec la multiplication virale. Enfin, ces virus, en principe oncolytiques, doivent être testés in vivo, dans des modèles animaux d'HCC.

## DISCUSSION, CONCLUSIONS

La thérapie virale oncolytique se base sur la capacité des virus lytiques à se multiplier et à se disséminer dans les cellules tumorales, entraînant leur destruction, sans pouvoir se propager dans les tissus sains. Cette stratégie a été d'abord explorée en utilisant des virus atténués, dans lesquels un gène viral est éliminé. Ces virus délétés montrent un pouvoir réplicatif différentiel dans les cellules malignes capables de compléter la fonction manquante, alors que les cellules saines ne le peuvent pas. Cependant, cette stratégie s'avère peu efficace, probablement du fait que la complémentation est partielle parce que les protéines virales cumulent plusieurs fonctions et que toutes ne sont pas complémentées par les cellules malignes. Le ciblage des virus oncolytiques au niveau transcriptionnel est utilisé comme une méthode alternative à la suppression des gènes viraux. En plaçant l'expression des gènes viraux essentiels sous la dépendance de promoteurs actifs spécifiquement dans les cellules tumorales, cette hypothèse propose de conserver l'expression des protéines concernées, et donc la production virale, dans les cellules tumorales, permettant ainsi de détruire ces cellules, et d'inhiber le cycle de réplication dans les cellules non ciblées où le promoteur spécifique est inactif. Si ce ciblage de l'expression peut entraîner une agressivité accrue vis à vis de la tumeur, cette stratégie s'avère aussi plus risquée en cas d'expression, même faible, du gène ciblé dans les cellules saines. Le ciblage transcriptionnel peut également être utilisé pour exprimer des gènes cytotoxiques depuis le génome viral infectant les cellules cancéreuses. Mon projet de thèse a été d'explorer la possibilité de développer des virus oncolytiques dérivés de l'HSV-1, ciblés au niveau transcriptionnel pour l'expression de gènes et la destruction spécifique des carcinomes hépatocellulaires (HCC), et d'analyser leur comportement dans des cellules saines et tumorales.

Dans ce but, nous avons sélectionné un ensemble de promoteurs, certains d'après des données de la littérature qui montraient un pouvoir de ciblage dans d'autres modèles viraux, (promoteurs hTERT, E2F1, AFP, HRE), d'autres au terme d'un raisonnement qui s'est appuyé sur l'outil informatique UniGene, une validation par RT-PCR et par ChIP, ainsi que par des tests d'activité luciférase après transfection et surinfection de cellules (promoteurs ANGPTL3, ADH6). Ces promoteurs ont été clonés en amont du gène de la luciférase de luciole et ont été introduits dans le génome du virus, toujours dans une même région intergénique (IGR20), et toujours dans la même orientation, afin de ne pas modifier l'expression des gènes voisins. Ces unités de transcription ont été introduites dans deux types d'HSV-1 : un virus sauvage (Cgal+) et un virus défectif, délété du gène codant pour la protéine essentielle très précoce ICP4 (D30EBA), de manière à comparer l'activité des promoteurs dans deux contextes infectieux très différents. Enfin, j'ai utilisé ces virus pour infecter des cellules tumorales (HCC ou autres) ainsi que des cellules non tumorales, incluant des hépatocytes humains frais, pour étudier certains paramètres de ces promoteurs. L'activité luciférase sensible est mesurée de façon précise. Ainsi, la nature quantitative des résultats permet d'explorer finement les variations de l'expression et m'a permis de créer plusieurs outils de caractérisation. J'ai ainsi défini, grâce à l'activité luciférase ; i) la force stricte des promoteurs, ii) les courbes de cinétiques absolues, iii) les courbes de cinétiques relatives au cycle de réplication virale et iiiii) l'activité différentielle dans différents types de cellules, que ce soit en culture de cellules ou sur animaux. Dans la dernière partie de ma thèse, j'ai utilisé deux de ces promoteurs (9xHRE et ANGPTL3) pour construire des virus oncolytiques, exprimant le

gène viral anti-apoptotique Us3 sous le contrôle de ces promoteurs. J'ai fini la construction de ces deux virus et confirmé leur nature recombinante par analyse de l'ADN et l'expression de la protéine Us3. J'analyse actuellement leur capacité répliquative. Les premiers résultats montrent que l'expression ciblée d'Us3 avec le promoteur 9xHRE, a permis de rétablir de manière significative la capacité du virus à se multiplier ; capacité perdue par le virus 17+ Us3- suite à la délétion du gène natif Us3.

De l'ensemble des résultats obtenus, il s'avère que la plupart des promoteurs étudiés ont une activité très faible, parfois nulle, dans les hépatocytes primaires humains frais et dans les cellules WRL68, qui possèdent plusieurs caractéristiques phénotypiques des hépatocytes. D'autres résultats, montrent que ces promoteurs ont également une très faible activité dans les cellules VERO. Autrement dit, ils n'induisent pas d'activité luciférase significative dans les cellules non cancéreuses. En revanche, presque tous ces promoteurs (le promoteur hTERT étant une exception) induisent l'expression du gène luciférase dans les différentes lignées cancéreuses testées, ce qui est tout à fait cohérent avec leur définition de promoteurs spécifiques de cancer. Un autre fait à souligner est que si les promoteurs de cancer non spécifiques d'un type de cancer particulier (E2F1, HRE) s'expriment dans toutes les lignées tumorales que nous avons testées (et parfois sur des cellules non tumorales mais en division active, comme le promoteur E2F1), les promoteurs spécifiques d'HCC (ADH6, ANGPTL3 et AFP) ne s'expriment que très faiblement dans des cancers autres que les HCC, montrant une spécificité remarquable. Il est de plus particulièrement important de signaler que ces promoteurs conservent cette activité différentielle lorsqu'ils sont placés dans le génome HSV-1. Cette propriété est la base même de l'hypothèse de virus oncolytiques à ciblage transcriptionnel.

Dans le cas d'un gène cellulaire, son activité dans une cellule particulière dépendra de la présence de facteurs et cofacteurs de transcription, mais aussi de facteurs épigénétiques, tels que la position du gène dans le noyau, son accessibilité, l'état de méthylation de son ADN, ainsi que de l'acétylation, méthylation et autres modifications des histones associées au gène en question. Lorsque les cellules sont infectées par HSV-1, on observe une répression très rapide et généralisée de l'expression génique, provoquée par l'action de protéines virales, surtout au niveau post-transcriptionnel (destruction des ARNm par la protéine virale vhs, inhibition de l'épissage par la protéine virale ICP27, comme nous l'avons dit au début de ce document). Plus tardivement, on observe une réduction généralisée de la transcription. Mais même dans ce cas, certaines protéines cellulaires continuent à s'exprimer sans modifications et d'autres sont activées, démontrant que certains facteurs de transcription restent présents et actifs dans les cellules infectées. Dans le cas d'un gène qui s'exprime à partir du génome viral, la situation est très différente car le génome viral n'est pas chromatinisé, au moins pendant la phase lytique de l'infection, suggérant que la plupart des facteurs épigénétiques n'agissent pas et que seule la présence de facteurs et cofacteurs de transcription jouent un rôle majeur au niveau de la régulation transcriptionnelle du génome viral. Les résultats que nous avons obtenus, suggèrent donc que les facteurs de transcription qui contrôlent l'expression des promoteurs cellulaires (ADH6, ANGPTL3, AFP) lorsqu'ils sont introduits dans le génome viral continuent à activer leur expression dans les cellules d'hépatome, alors que leur absence expliquerait la faible activité de ces promoteurs dans les hépatocytes et les cellules WRL68. D'autres équipes ont observé des résultats similaires aux nôtres, que ce soit dans le cadre des HCC ou dans celui de promoteurs spécifiques d'un autre type de tumeur (153).

D'autres informations pertinentes pour cette discussion proviennent de nos expériences de cinétique d'expression ou de l'infection des cellules à différentes multiplicités. En particulier, lorsque les cellules sont infectées à faible multiplicité, nos résultats ont montré un effet probable de la multiplication virale sur l'activité des promoteurs. La permissivité des cellules à l'infection HSV-1 est, ainsi, un phénomène à conserver et à considérer dans la construction des virus oncolytiques. Cette hypothèse confirme d'ailleurs des données de la littérature qui montrent que le virus oncolytique atténué HSV-1 G207, dans lequel deux gènes sont absents : celui qui code pour la protéine 34.5 (impliqué dans le contrôle d'une réponse antivirale) et celui codant pour la protéine ICP6 (impliquée dans la promotion de la réplication virale) est plus efficace en terme d'oncolyse que le virus simplement délété, HSV-1  $\Delta$ 34.5.

Les études de l'activité des promoteurs d'intérêt au cours de cinétiques, suggèrent que la plupart des promoteurs analysés (ANGPTL3, ADH6, 9xHRE) se comportent comme des gènes viraux de type  $\beta$ , lorsqu'ils s'expriment à partir du génome viral, c'est à dire, que leur activité dépend de la présence de la protéine virale très précoce ICP4 et pas de la réplication du génome viral. Ces promoteurs s'expriment donc à partir du génome viral parental et pas à partir des génomes nouvellement répliqués. D'ailleurs, l'intensité de l'expression luciférase induite par ces promoteurs est très proche de celle du promoteur du gène Us3, un promoteur représentatif des promoteurs de type  $\beta$ . Ceci est intéressant aussi parce qu'il est important que le ciblage du gène Us3 par les promoteurs spécifiques d'HCC permette une expression d'Us3 la plus proche possible de l'expression naturelle, en quantité et en cinétique, bien que limitée aux cellules malignes. Le promoteur AFP semble particulier en ce qu'il commence son expression en absence d'ICP4, mais semble activé par la présence de cette protéine, combinant donc des propriétés de type  $\alpha$  et  $\beta$ . Malgré cette différence, l'activité différentielle de la luciférase dans les hépatomes et hépatocytes est très proche lorsque cette protéine est placée sous contrôle du promoteur AFP ou sous celui du promoteur ANGPTL3. Ceci est particulièrement intéressant, du fait que le promoteur AFP, considéré comme le prototype du promoteur ne s'exprimant que dans les HCC, ne s'exprime que dans environ 50% de ces tumeurs. Le promoteur ANGPTL3 pourrait être donc un promoteur de substitution lorsque AFP ne s'exprime pas. Le comportement du promoteur 9xHRE est, à nouveau, particulièrement intéressant, dans la mesure où il est totalement inactif en absence d'ICP4, mais est fortement activé par le DFO, même en absence de cette protéine virale transrégulatrice. Ce promoteur inductible, et donc contrôlable, semble également très intéressant pour une utilisation dans d'autres types de vecteurs HSV-1, oncolytiques ou pas. Les résultats de l'étude oncolytique, avec ce promoteur particulièrement, devraient permettre de comprendre comment transférer les données obtenues grâce aux activités luciférase vers l'activité oncolytique de ces virus. La logique de comparaison peut s'étendre à l'ensemble des paramètres définis par le système luciférase (force, cinétique, dépendance, activité différentielle) afin de déterminer celui ou ceux qui ont un rôle déterminant dans le ciblage transcriptionnel.

**Méthodologie.** En principe, dans le cas de la recherche de promoteurs cellulaires pour cibler un virus, l'approche transcriptomique semble la plus adéquate dans le sens où elle va mettre en évidence tous les promoteurs actifs, alors qu'une approche protéomique ne mettra en évidence que la traduction des ARN messagers. Néanmoins, nos études de RT-PCR semi quantitatives n'ont pas mis en évidence d'activité ANGPTL3 endogène dans les

cellules Hep3B alors que ce promoteur montre une activité dans ces cellules quand il s'exprime depuis le génome HSV-1 (figure 21). Par ailleurs, les techniques de protéomique ne permettent pas une quantification précise des produits de l'expression génique. A l'inverse, les tests biochimiques utilisés (luciférase,  $\beta$ -gal) sont des outils quantitatifs sensibles et précis. De plus, ces protéines ne subissent pas de modifications postransductionnelles et sont actives dès leur synthèse, ce qui évite des variations dues aux types cellulaires. Ces activités enzymatiques sont donc directement proportionnelles à la quantité d'enzyme, constituant des outils de choix pour la comparaison de l'activité des promoteurs, entre eux et entre différents types cellulaires. Des données de RT-PCR quantitative permettraient de faire un lien entre les données virtuelles quantitatives et nos mesures d'activité luciférase, également quantitatives. A cette fin, il serait intéressant de reconduire ces expériences. L'objectif de cette mise au point est d'utiliser l'outil UniGene pour la recherche de promoteurs cellulaires utilisables en virothérapie oncolytique. La comparaison, avec les virus recombinants, des promoteurs issus d'UniGene, et bien qu'elle porte sur peu de promoteurs (ADH6, AFP et ANGPTL3), ne confirme aucune valeur prédictive aux figures 1, 2 et 3. Par contre, les tableaux 2, 6 et 7 montrent des corrélations entre la spécificité tumorale déduite de l'analyse par UniGene et les activités différentielles telles qu'elles sont présentées dans nos résultats. Du point de vue de l'activité différentielle, nos études ont confirmé l'avantage d'utiliser le promoteur AFP par rapport à celui ANGPTL3. La confirmation de cette différence dans un contexte de ciblage oncolytique permettrait de valider l'efficacité d'UniGene pour trouver des promoteurs de ciblage tumoral. Par ailleurs, si le système luciférase permet d'étudier l'activité des promoteurs de par l'absence de modifications post transcriptionnelles, il peut se révéler moins efficace pour prédire la présence fonctionnelle d'une protéine nécessitant au cours de sa synthèse des modifications post-transcriptionnelles. De plus, les recherches menées par le Dr. Ed Wagner montrent que la transcription des ARN viraux  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  commencent simultanément, suggérant qu'une protéine très précoce  $\alpha$  nécessite non seulement une transcription à l'aide d'un promoteur  $\alpha$  mais également des évènements post transcriptionnels propres à garantir sa synthèse très précoce (<http://darwin.bio.uci.edu/%7Efaculty/wagner/hsv9fnew.html>) et (<http://darwin.bio.uci.edu/%7Efaculty/wagner/rnatype.html>). D'après ces considérations, l'efficacité oncolytique d'un couple promoteur cellulaire-gène viral n'est pas entièrement prédictible à partir de l'activité luciférase dépendant de son promoteur. L'évaluation doit être menée au niveau protéique par une analyse fonctionnelle de la protéine virale ciblée.

**9xHRE.** Parmi les promoteurs étudiés, le promoteur 9xHRE s'est révélé intéressant à plus d'un titre si on tient compte des différents résultats d'analyse des paramètres étudiés (cinétiques, intensité, activité différentielle). En effet, l'induction par le DFO modifie à la fois sa force, sa cinétique absolue (figure 24), sa cinétique relative (figure 26) et son activité différentielle (tableau 7). Son utilisation pour cibler Us3 permettra de définir les paramètres du promoteur Us3 se rapportant aux différentes fonctions de la protéine mais également à déterminer lequel ou lesquels de ces paramètres sont importants pour le ciblage oncolytique. Enfin, ce promoteur semble particulièrement intéressant pour une approche thérapeutique. L'hypoxie augmente, en effet, la prolifération, l'angiogénèse, les métastases, la chimiorésistance, et la radiorésistance des carcinomes hépatocellulaires. Elle supprime également la différenciation et l'apoptose des HCC et provoque par conséquent la résistance à l'embolisation transartérielle (avec

ou sans chimiothérapie) (230). Une thérapie permettant de cibler l'hypoxie des HCC pourrait ainsi être associée à l'embolisation transartérielle. L'activation du promoteur HRE dépend de la stabilisation du facteur de transcription HIF-1. HIF-1 ayant une expression constitutive, sa stabilisation est mise en évidence indirectement grâce aux produits d'expression des gènes répondant à HIF tel que le gène de la protéine carboanhydrase 9 (CA9) et le gène de la lisyl oxydase (LOX). De plus l'hypoxie est un phénomène complexe dans lequel plusieurs réponses cellulaires permettent à la cellule de survivre. Certaines de ces conditions peuvent modifier le cycle de réplication d'HSV-1. Une exploration approfondie de ces réponses en fonction du type cellulaire permettra de comprendre davantage l'efficacité lytique du virus oncolytique 9xHRE Us3. Dans ce sens, une étude montre que l'absence de la protéine p53 favorise la réplication d'HSV-1 en hypoxie (60).

**Us3.** Dans le ciblage oncolytique, le choix du gène à cibler semble une étape critique, dans la mesure où, dans cette stratégie, on cherche à cibler la multiplication et la dissémination virales. La production optimale du virus dépend de l'activité de différentes fonctions virales s'exprimant de manière régulée et à différents moments du cycle viral. Le choix du gène à cibler est lié à la cinétique d'activité de son promoteur naturel mais également à ses fonctions dans la cellule infectée. La protéine Us3, que nous avons choisi, est une protéine kinase multifonctionnelle qui phosphoryle de nombreuses protéines, virales et cellulaires, et est impliquée de diverses manières dans la multiplication virale, dont l'inhibition de l'apoptose. Des données publiées concourent à faire d'Us3, un gène à cibler en virothérapie oncolytique. Ainsi sa délétion entraîne une atténuation qui est protectrice vis à vis de l'organisme (127). Par ailleurs, un virus Us3-induit plus facilement l'apoptose dans les cellules cancéreuses, et augmente l'apoptose induite par chimiothérapie (96). Certaines fonctions d'Us3 sont particulièrement importantes pour le développement du cycle viral et les virus qui ne les contiennent pas se répliquent mal. Après délétion, le gène Us3 a été réintroduit dans le même locus où les différents promoteurs ont été étudiés, afin de pouvoir exploiter dans le système oncolytique, les paramètres créés avec le système luciférase. L'étude des virus oncolytiques permettra de confirmer si la fonction antiapoptotique d'Us3 est responsable de l'atténuation du virus Us3-, ou bien s'il s'agit d'une autre fonction d'Us3. Des résultats préliminaires et d'autres publiés sur la protéine Us3 du virus PRV qui est un virus herpétique, proche d'HSV-1 (52), tendent à démontrer que la fonction antiapoptotique d'Us3 n'est pas seule en cause dans le contrôle de la production de virus par cette protéine. L'exploration de toutes les fonctions d'Us3 permettra de comprendre l'effet oncolytique et toxique des virus recombinants Us3. La perception des rôles d'une protéine et partant, de son importance en stratégie de ciblage oncolytique, nécessite le dessin de son interactome. Etablir l'interactome de l'infection HSV-1 entre les protéines cellulaires et les protéines virales est une priorité pour faire évoluer les virus oncolytiques atténués ou ciblés. La comparaison de cet interactome standard avec l'interactome spécifique des cellules ciblées est probablement la meilleure façon de décider du gène viral à cibler. Parce que les études de DNA microarray sont plus facilement réalisables que les protéomes, il est plus raisonnable pour le moment de chercher à faire ce choix sur la base des gènes surexprimés dans la tumeur ciblée et des gènes surexprimés dans ces mêmes tumeurs suite à l'infection par un virus HSV-1. Dans ce sens, des résultats intermédiaires ont déjà été obtenus, permettant de définir une carte très partielle de l'interactome infectieux d'HSV-1. Ainsi, une étude a permis de déterminer l'importance du gène SOCS1 dans la réplication d'un virus oncolytique HSV-

1 délété des gènes codant les protéines ICP34.5 et ICP6 (133). Egaleme<sup>nt</sup>, intégrée dans le projet THOVLEN, une étude semblable, mais au niveau protéique, a mis en évidence des protéines cellulaires cibles de l'infection par HSV-1 dans les cellules d'HCC Huh7 (186). Ces études sont encore trop peu nombreuses mais représentent la voie vers une construction raisonnée des virus oncolytiques.

## PERSPECTIVES

De par l'expression même de la protéine luciférase, nos résultats suggèrent que l'approche du ciblage de l'expression au niveau transcriptionnel est viable et peut avoir des applications cliniques intéressantes. Cependant, le fait que parfois des activités, certes faibles, mais non négligeables, soient mesurées dans les cellules saines (en fonction de la multiplicité d'infection ou des temps post-infection) suggère que le ciblage transcriptionnel d'un seul gène ne donne pas les garanties suffisantes de sécurité pour l'approche clinique. Des alternatives pour augmenter la biosécurité de cette approche pourraient être de cibler au moins deux gènes différents, avec des promoteurs ciblés différents, ou bien de combiner cette approche avec d'autres modalités de ciblage, par exemple au niveau de la pénétration de la particule virale, ou bien en exploitant l'expression différentielle des miRNAs entre cellules normales et cellules malignes, pour bloquer la multiplication virale dans les cellules saines. Les résultats de l'étude oncolytique du gène Us3, correspondant à la dernière partie de mon travail de thèse devraient être particulièrement informatifs quant à la pertinence de cette approche.

Concernant les perspectives immédiates, il s'agira d'achever les études en cours, à savoir (i) l'étude de l'activité antiapoptotique inductible à partir du virus HSV-1 9xHRE Us3, (ii) les études sur la capacité répliquative différentielle dans des cellules d'HCC et des hépatocytes (ou cellules WRL68) dans des conditions d'hypoxie et de normoxie pour ce même virus, ainsi que l'étude de la capacité répliquative du virus HSV-1 ANGPTL3 Us3 dans les HCC. Dans ce cas, il est important de ne pas se limiter à un seul type d'hépatome, et nous en testerons plusieurs. Enfin, (iii) les études concernant le pouvoir oncolytique seront poussées *in vivo*, chez des souris athymiques portant des xénogreffes d'HCC humains. Pour accomplir ces tâches, je suis actuellement en train de mettre au point des tests d'induction et d'inhibition de l'apoptose et de programmer des expériences en utilisant des incubateurs permettant de recréer les conditions d'hypoxie, en collaboration avec une équipe lyonnaise spécialisée dans cette thématique et possédant les équipements nécessaires. Nous sommes également en train de générer des vecteurs HSV-1 de type amplicon, exprimant l'unité de transcription Us3 sous contrôle du promoteur 9xHRE. Ces vecteurs devraient faciliter l'étude des propriétés antiapoptotiques inductibles de cette unité de transcription, ainsi que d'autres propriétés phénotypiques de la protéine Us3, dans la mesure où Us3 sera la seule protéine virale exprimée à partir des vecteurs amplicons.

A plus long terme, et en fonction des résultats obtenus, il me semble important (i) d'explorer le ciblage d'autres gènes, à la place ou en plus d'Us3, et en particulier des gènes viraux essentiels, (ii) de cibler simultanément au moins deux gènes viraux, (iii) de combiner le ciblage d'au moins un gène viral avec le ciblage d'un gène toxique, visant à augmenter le pouvoir anticancéreux du virus oncolytique (gène régulateur de la réponse immune, gène anti-angiogénique, gène capable de moduler la dissémination du virus en agissant sur la matrice extracellulaire, collagénases), et (iv) de combiner le ciblage transcriptionnel avec une autre stratégie de ciblage, au niveau de la pénétration ou au niveau post-transcriptionnel (miRNAs). Par ailleurs, nous avons dit que mon programme de thèse faisait partie d'un ensemble plus vaste, développé dans le contexte du projet Européen THOVLEN, et d'autres équipes de ce réseau sont en train de développer des virus ciblés à d'autres niveaux. Nous espérons, dans un avenir proche, combiner donc au moins deux types de ciblage et tester ces virus oncolytiques doublement ciblés sur des

souris athymiques portant des hépatomes humains, ainsi que sur des modèles de souris plus pertinents, comme des souris immunocompétentes portant des hépatomes de souris (implantés ou chimioinduits), que nos collaborateurs de l'Université de Navarre (Espagne) ont récemment développés. Enfin, l'hypothèse majeure de cette étude est que les virus oncolytiques ciblés sont supérieurs aux virus oncolytiques atténués. Ce travail doit donc se finir par la comparaison du pouvoir oncolytique et de la toxicité de ces deux types de virus oncolytiques (en utilisant un virus délété du gène 34.5 par exemple) dans les modèles d'HCC.

## **ANNEXE - ARTICLE**

### **Novel tumour-specific promoters for transcriptional targeting of hepatocellular carcinoma by herpes simplex virus vectors**

Pelagia Foka<sup>1§</sup>, Aldo Pourchet<sup>2§</sup>, Ruben Hernandez-Alcoceba<sup>3</sup>, Polyxeni P. Doumba<sup>4,5</sup>, George Pissas<sup>1</sup>, Vlassis Kouvatsis<sup>1</sup>, Georgia Dalagiorgou<sup>1</sup>, Dorothea Kazazi<sup>1</sup>, Peggy Marconi<sup>6</sup>, Maria Giovanna Foschini<sup>6</sup>, Roberto Manservigi<sup>6</sup>, Manousos M. Konstadoulakis<sup>4</sup>, John Koskinas<sup>5</sup>, Alberto L. Epstein<sup>2</sup>, Penelope Mavromara<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Molecular Virology Laboratory, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece.

<sup>2</sup> Université de Lyon, Lyon, F-69003, France; Université Lyon 1, Lyon, F-69003, France; CNRS, UMR5534, Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire, Villeurbanne, F-69622, France.

<sup>3</sup> Division of Hepatology and Gene Therapy, CIMA, Foundation for Applied Medical Research, School of Medicine, University of Navarra, Pamplona, Spain.

<sup>4</sup> Laboratory of Surgical Research, Medical School of Athens, Hippokration Hospital, Athens, Greece.

<sup>5</sup> 2<sup>nd</sup> Department of Internal Medicine, Medical School of Athens, Hippokration Hospital, Athens, Greece.

<sup>6</sup> Department of Experimental and Diagnostic Medicine, Section of Microbiology, University of Ferrara, Ferrara, Italy.

\*Corresponding Author: Penelope Mavromara – Molecular Virology Laboratory, Hellenic Pasteur Institute, 127 V. Sofias ave., 11521, Athens, Greece, e-mail: (penelopm@pasteur.gr), tel: +302106478877

§ The first and second author contributed equally to this work and should be regarded as joint first authors

Short title: Novel hepatoma specific promoters for cancer therapy

Keywords: HSV vectors, transcriptional targeting, gene therapy, virotherapy, hepatoma, Angiopoietin-like-3 promoter

## **Abstract**

**Background:** Hepatocellular carcinoma (HCC) is a cancer of poor prognosis and such limited success in patient treatment, that it makes an excellent target for gene therapy and viral oncolysis. To this end, herpes virus simplex type-1 (HSV-1) is one of the most promising viral platforms for transferring therapeutic genes and the development of oncolytic vectors that can target, multiply in and eradicate hepatoma cells via their lytic cycle. Enhanced efficacy and specificity of HSV-1-based vectors towards HCC may be achieved by using HCC-specific gene promoters in order to drive selective viral gene expression and accomplish conditional replication and/or to control the expression of therapeutic genes. However, careful verification of promoter function in the context of the replication-competent HSV-1 vectors is required. Our aim was to identify novel HCC-specific promoters that could efficiently direct transgene expression to HCC cells and maintain their activity during active viral replication.

**Results:** Extensive search of publicly available microarray data from human HCC biopsies detected eight novel candidate genes induced primarily in HCC, as compared to normal liver: [Angiopoietin-like-3 (ANGPTL-3), Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 8 (CYP2C8), Vitronectin (VTN), Alcohol dehydrogenase 6-class V (ADH6), Apolipoprotein B (ApoB), Fibrinogen beta chain (FGB), Inter-alpha-globulin-inhibitor H3 (ITIH3), Inter-alpha-globulin-inhibitor H1 (ITIH1)]. Specific HCC expression and active gene transcription were confirmed in human liver and non-liver cell lines and further evaluated in primary neoplastic cells from hepatitis C and B virus (HCV- and HBV)-associated HCC patients, using RT-PCR and chromatin immunoprecipitation. High

promoter activity and specificity in the presence of HSV-1 infection and from within the viral genome, was validated, both *in vitro* and *in vivo*.

**Conclusion:** We identified and experimentally characterised novel hepatoma-specific promoters, valuable for cancer-specific gene therapy using HSV-1 vectors.

## **Introduction**

HCC is the commonest primary liver cancer and the fifth most prevailing neoplasia worldwide. The estimated global death toll is approximately 600,000–1,000,000 annually. Although HCC occurrence is still relatively low in the developed Western countries compared to South-Eastern Asia and Africa, new cases have been steadily on the rise over the past two decades [1]. Only a very small fraction of patients with HCC can undergo surgical resection or liver transplantation. Thus, the vast majority of them remain untreated and novel therapies are desperately needed.

Combating cancer with oncolytic viruses (OVs) is a revolutionary approach with great promise for HCC therapy [2]. OVs display the unique property of selectively multiplying in and killing cancer cells via their normal replication pathways, without causing excessive damage to non-neoplastic tissue. Additionally, the amplification of the oncolytic effect in the tumour mass due to spreading of the initially low viral load and the capacity to complement traditional treatments - such as chemotherapy or radiotherapy - without interference, may enhance their inherent anti-tumour action [2]. Besides oncolytic virotherapy, replication-defective recombinant viruses have been intensively investigated as means for transferring a variety of therapeutic genes into cancer cells, providing yet another strategy for cancer treatment [3].

Of the several viral vectors under study, genetically engineered, herpes simplex virus type-1 (HSV-1) recombinants constitute a promising platform for cancer gene therapy and virotherapy with encouraging results in clinical trials for brain gliomas and other human malignancies [4]. However, in order to overcome limitations regarding efficacy and safety of early generations of HSV-1-based vectors, retargeting viral cell lysis (viral oncolysis) or therapeutic gene expression (gene therapy) to neoplastic tissue is required [4]. To this end, the commonest applied strategy is transcriptional retargeting, whereby cellular tumour-specific promoters restrict the expression of therapeutic genes or viral genes essential for viral replication and virulence only to cancer cells [5]. In this way, natural progression of the viral lytic cycle or expression of a potentially toxic transgene would be inhibited in normal cells, where these promoters are not active [2, 5]. Additionally, “arming” of oncolytic HSV-1 with therapeutic and suicide transgenes (oncotoxic cytokines, anti-angiogenic peptides, immune-stimulating proteins and prodrug-converting enzymes) and efficiently expressing them under the control of multiple tumour-specific promoters, complements the novel strategies employed to achieve both tumour-specificity and enhanced oncolysis [5]. For example, recent clinical trials have suggested that arming oncolytic HSV-1 with immunostimulatory cytokines such as granulocyte macrophage – colony stimulating factor (GM-CSF) are promising in advanced cancer patients [6]. The use of endogenous viral promoters for the control of transgene expression implies that both viral replication and production of the therapeutic protein share the same regulation. However, transcriptional control of potentially toxic genes with HCC-specific promoters constitutes an additional level of safety of these vectors.

This work aims to identify novel HCC-specific promoters for cancer-specific gene therapy and viral oncolysis. We applied a cross-comparison of multiple gene expression data sets from human HCC biopsies, in order to find novel HCC-specific promoters for transcriptional targeting to HCC. Furthermore, the promoters of the most promising genes were placed in front of luciferase and tested extensively for specific activity under HSV-1 infection conditions and from the viral backbone, both *in vitro* and *in vivo*, therefore confirming their suitability for the selective targeting of virus expression in HCC.

## **Experimental Procedures**

### ***Materials***

The anti-gB antibody was a gift from Prof. Manservigi (University of Ferrara, Italy). Human liver specimens from tumour and non-tumour regions, who had undergone anatomic liver resection with curative intent, were obtained from patients with HCC following consent. Collection of the liver specimens was approved by the Ethical and Scientific Committee of Hippokration Hospital of Athens.

### ***Cells and Animals***

The hepatoma cell lines Huh-7, Hep3B and the hepatoblastoma cell line HepG2, were maintained in low glucose DMEM. Embryonic hepatocytic-like WRL-68, cervical adenocarcinoma HeLa, brain neuroblastoma SK-N-SH, mouse hepatoma BNL 1MEA.7R.1 and African green monkey kidney Vero cells were kept in high glucose DMEM, whereas renal clear cell carcinoma RCC10 and the T-cell lymphocytic Jurkat cells were kept in RPMI. All culture media were supplemented with 10%(v/v) fetal bovine serum (FBS). Hepatocytes from human liver specimens were enzymatically isolated with 0.1%(w/v)

collagenase type IV and purified by triple centrifugation at 700 rpm for 12min, or were purchased from Lonza. Flow cytometry was employed to measure viability, purity and functionality of hepatocytes using 7-Actinomycin D (BD Pharmingen™), Hep Par-1 (Dako) and albumin antibodies (Dako), respectively. For a typical culture post-isolation, all values were above 85%.

For the animal experiments, tumour xenografts were induced in the flank of 5-6 weeks-old athymic *nu/nu* and Balb/c mice (Charles River Laboratories) by subcutaneous inoculation of  $10^7$  Huh-7 cells and  $2 \times 10^6$  BNL cells, respectively. When tumours reached 200-500mm<sup>3</sup> (typically 50-70 days after cell inoculation in the case of Huh-7 cells and 30 days following inoculation of BNL cells), viruses were resuspended in 50µl saline and injected intratumourally. For intrahepatic administration of viruses, animals were anaesthetised, underwent laparotomy and were injected directly with the viruses into the left liver lobe. For *in vivo* bioluminescence detection, animals received 3mg D-Luciferin intraperitoneally, dissolved in 100µl PBS. Mice were then anaesthetised and placed in a dark chamber connected to a CCD camera. Ten minutes after substrate administration, photon emission was quantified and analysed using Living Image Software (Xenogen). All procedures were carried out following protocols approved by the local ethical committee in accordance with recommendations for proper care and use of laboratory animals.

### ***Plasmids and transient transfection assays***

The (-929/+109) human ANGPTL-3 promoter construct was a kind gift from Dr Delerive (GSK Research Laboratories). The (-218/+51) human E2F-1 promoter was obtained by PCR amplification using the pSEHE2F plasmid [7]. The (-358/+57) human ADH6

promoter was obtained by PCR amplification using genomic DNA from HepG2 cells. The (-298/+119) human ApoB promoter was cloned by PCR from the (-1800/+124) ApoB-CAT plasmid (a kind gift from Dr Kardassis, FORTH, Greece). In all cases, the promoters were cloned into pGL3-basic to drive luciferase expression.

Transfection of cell monolayers was carried out using JetPEI (Polyplus) and 2 $\mu$ g of DNA plasmid. For viral infection, cells were transfected for 24h and then infected for the appropriate time points before harvesting. Luciferase activity was determined using a commercially available kit (Promega) and normalised to total protein levels. Each transfection was carried out in triplicate and repeated at least 3 times.

### ***mRNA Expression analysis***

Total cellular RNA was prepared using the RNeasy™ Plus Mini total RNA isolation kit (Qiagen). Semi-quantitative RT-PCR was carried out using 1 $\mu$ g of RNA. All conditions were in the exponential phase of amplification and, therefore, provided a direct correlation between the amount of products and RNA template abundance in the samples. PCR products were analysed on a 2%(w/v) agarose gel and the Quantity-One software (BioRad) was employed for densitometric analysis.

### ***Chromatin Immunoprecipitation Assays (ChIP)***

ChIP analyses were carried out using the ChIP-IT™ Express and human ChIP-IT™ Control kits (Active Motif) according to the manufacturer's instructions. The DNA immunoprecipitated fractions were subjected to PCR with primers spanning sequences that included the respective TATA-boxes and ended past the translational start of the genes' open reading frame (ORF).

### ***Construction of Viruses and Viral infections***

The ANGPTL-3, E2F-1 and HCMV recombinant viruses were constructed using HSV-1 Cgal+ [8] as backbone. This virus expresses  $\beta$ -galactosidase under HCMV promoter from the intergenic region (IGR) 59. Briefly, a transgene cassette expressing GFP under the control of HCMV promoter was introduced into IGR20 of the HSV-1 Cgal+ genome by homologous recombination in Vero cells. The recombinants were identified and isolated based on green plaque phenotype. Cassettes expressing HCMV-, E2F-1- or ANGPTL-3-luciferase were then introduced at the same locus, granting these recombinants a white plaque phenotype. Successful recombination was verified by restriction profiling with NotI, PCR amplification of the luciferase ORF and luciferase enzymatic tests. Viral infections were carried out at multiplicity of infection (MOI) 5. To assess uniform infection between recombinants,  $\beta$ -galactosidase activity was measured using the  $\beta$ -galactosidase enzyme assay system (Promega) according to manufacturer's instructions and luciferase activity was normalized to this.

### ***Statistical analysis***

Statistical analysis was performed using Student's t-test and one-way ANOVA with  $P \leq 0.05$  considered as statistically significant.

## **Results**

### ***Bioinformatics analysis of microarray studies***

In order to identify novel HCC-specific genes, we utilised an approach based on cross-comparison of multiple gene expression data sets from tumour liver biopsies. For this, we generated a series of 22 gene lists (a total of 771 genes) reported to be differentially

expressed in microarray studies from matched normal and tumour liver biopsies of HCC patients. The studies (see supplementary table) were selected irrespectively of the characteristics of the individual samples examined, i.e. age and sex of patients, tumour stage and status of HBV/HCV infection, in order to include genes highly expressed in HCC under different disease aetiologies and patient conditions. Different gene identifiers were converted to the same format using the “Batch Lookup” feature of the bioinformatics tool MatchMiner [9] so that the lists could be easily compared pairwise with the “Batch Merge” feature of MatchMiner. The union gene set of these merges - “up-regulated in cancer cluster”- contained 101 genes common to at least two studies and was compared to a “normal liver cluster” (265 genes) list [10]. This list was used as an independent source of normal liver gene expression, so that non-HCC specific genes could be filtered out (Fig. 1A). Due to annotation inconsistencies between the various microarray platforms, a large number of replicate identifiers were present in the resulting comparison. After eliminating those, 23 potentially HCC-specific genes remained and were used to query Unigene, a NCBI database for the retrieval of expressed sequence tag (EST) profiles. Based on ESTs, Unigene provides “virtual northern blot” data for all human tissues, a variety of tumours and different stages of development [11].

Filtering criteria were employed to make the most appropriate choices for the candidate genes. Briefly, selected genes had to exhibit increased liver specificity, hence be expressed in as few tissues as possible, and their EST profile representations be biased towards liver tumour (liver cancer-specificity). Also, enhanced expression in foetal tissue was sought after because there has been evidence to suggest that it bears strong similarity to neoplastic tissue [12]. Finally, the ratio of tumour to normal expression,

provided by Unigene in transcripts per million (TPM) was used as an approximation of gene expression, where the highest ratio signified the most HCC-specific gene expression (Fig. 1B). From this latter filtering, 17 candidate genes were singled out (Table 1). Eight of them had available cloned and characterised promoters that could be readily used for production of oncolytic viruses or to target therapeutic gene expression to HCC. The expression profiles of those genes as well as their promoter activity were investigated thoroughly and will be presented thereafter. Alpha fetoprotein was not included in this profiling, since it is a well-characterised liver cancer-specific gene.

### ***Selective expression of candidate genes in cells of hepatic origin***

To verify tissue specificity of the candidate genes, we employed RT-PCR in cell lines of hepatic and non-hepatic origin. As shown in Figure 2A, the mRNA transcripts examined were selectively expressed in all tested hepatoma cell lines, albeit in variable extent. As expected, the selected genes were not expressed in cell lines of non-hepatic origin, with the exception of VTN that was also expressed in HeLa cells.

To examine the expression of the candidate genes in cancerous and non-cancerous human liver tissue, matched primary cultures of tumour and non-tumour cells from surgical hepatectomies of HCC patients (2 patients with HCV-associated HCC and 4 patients with HBV-associated HCC) were established and characterised thoroughly so that they contained a pure and functional hepatocytic population. At the same time, tissue from the hepatectomy was directly used to rule out the presence of tissue culture artifacts. mRNA was isolated and RT-PCR was carried out. As demonstrated in a representative experiment shown in Figure 2B, the expression profile of most genes was similar in both HBV+ and HCV+ columns and in agreement with our microarray analysis.

Densitometry analysis of semi-quantitative PCR carried out on the hepatectomies (data not shown), showed that the most strongly up-regulated genes in the cancer samples were ApoB, ADH6, ANGPTL-3, ITIH1 and ITIH3.

### ***mRNA expression of candidate genes in cells infected with the HSV-1 virus***

Considering that HSV-1 infection modulates the expression of the majority of cellular mRNAs during infection [13], we characterised the expression of the candidate genes in cells infected with HSV-1. Huh-7 cells were infected at MOI 5 with HSV-1 Cgal+ and total RNA was harvested at time points up to 8h post infection (p.i.). mRNA expression was analysed by RT-PCR. The course of infection in Huh-7 was assessed by western blot analysis of the expression of the immediate early ICP4 (Santa-Cruz) and the late glycoprotein gB viral proteins (data not shown). Figure 2C shows that compared to the non-infected control, mRNA levels of all candidate genes were not influenced by the infection.

### ***ChIP analysis using RNA polymerase II advocates strong transcriptional activity of the target gene promoters during viral infection***

While detection of steady-state mRNA levels of the candidate genes during viral infection may offer an indication of their rate of transcription, this has been proven inadequate to demonstrate the transcriptional activity of a gene by a number of studies [14 and references therein]. This is particularly true in the case of genes possessing very stable mRNAs transcripts or, conversely, ones prone to enhanced degradation. Therefore, we evaluated the transcriptional activity of the candidate gene promoters by performing ChIP assays with an RNA polymerase II antibody (Active Motif) in mock infected Huh7 cells and at 6h.p.i with HSV-1 Cgal+ virus. Neuropeptide Y (NPY), whose

mRNA transcript is not expressed in the liver (Fig. 2D), was used as a negative control. PCR product enrichment with the RNA polymerase II (lanes 1 and 4), as compared to a non-specific IgG (lanes 2 and 5), was evident in all cases but the control gene (Fig. 2E). Similar results from both mock and 6hp.i. cell extracts suggested that HSV-1 infection did not affect promoter activity of the candidate genes.

### ***Transcriptional activity of candidate gene promoters under infection conditions***

Of all candidate genes under study, three genes that exhibited the highest expression in primary cancer cells from HCV+ and HBV+ infected patients, as opposed to their non-cancer counterparts - namely ADH6, ApoB and ANGPTL-3 - were selected for further analysis. It was imperative to examine the respective promoters' activity *in vitro*, separated from endogenous adjacent enhancing and silencing sequences. The promoter lengths chosen for the corresponding luciferase reporter constructs were based on previous analyses of their activity in the liver [15, 16, 17]. In the first series of experiments, we carried out transient transfections in the hepatoma Huh-7, Hep3B and HepG2 cells and non-liver cell lines in the absence of HSV-1 infection. An HCMV-luciferase construct was used as control for transfection efficiency between cell lines (data not shown). The cells were harvested at 36h post-transfection (p.t.) and the relative luciferase activity of each promoter was plotted as fold ratio of the corresponding value obtained from Huh-7, a hepatoma cell line that supports the growth of both HCV and HBV viruses [18, 19]. As seen in figures 3A, 3B and 3C, all regulatory sequences examined, were very active in the hepatoma cell lines, albeit to varied extents, but exhibited no activity in cell lines of non-liver origin.

Subsequently, the promoter constructs were transfected in Huh7 cells and 24h post-transfection the cells were super-infected with the HSV-1 Cgal+ virus at MOI 5. A time course of up to 10hp.i. was carried out in order to evaluate the strength of promoter activity under full infection conditions. Non-infected control extracts were harvested at the beginning and end of infection (24h and 34h post-transfection, respectively). As demonstrated in Figure 3D, there was no substantial change in luciferase activity during the time of infection. The slight down-regulation observed at 2hp.i. was not statistically significant between experiments ( $p>0.05$ ). These results indicate that the activity of the selected promoter sequences is not affected by virus infection. Overall, our results indicate that the candidate promoter constructs contain all sequences necessary for hepatoma-specific expression and that they remain active even in hepatoma cells infected by HSV-1.

***The ANGPTL-3-Luciferase recombinant HSV-1 virus expresses luciferase specifically in hepatoma cells in vitro and intratumourally in vivo***

Next, we sought to evaluate the behaviour of a candidate promoter when resident in the HSV-1 genome, as it cannot be anticipated that a promoter will behave similarly when expressed from the viral genome and from an expression plasmid vector or the native chromosomal locus. The ANGPTL-3 promoter was chosen in the first instance for this study. To this end, we constructed a recombinant HSV-1 virus carrying the (-929/+109) ANGPTL-3-luciferase transcriptional cassette in the IGR20 locus of the viral genome (ANGPTL-3-luc virus) (Fig. 4A) and then characterised the ANGPTL-3 promoter-driven luciferase activity, both in *vitro* and *in vivo*. At the same time, we constructed a control virus containing the HCMV-luciferase cassette (HCMV-luc virus). As shown in Figure 4B, the HCMV-luc virus was able to express luciferase in all cell lines tested, including

normal hepatocytes and the WRL-68 cells that are similar morphologically and functionally to primary liver cultures [20]. In contrast, the ANGPTL-3-luc virus only showed transgene expression in Huh7, Hep3B and HepG2 cells, proving the HCC-specificity of the ANGPTL-3 promoter in the context of the HSV-1 genome. Additionally, compared to the wild type control that produced negligible luciferase units, the ANGPTL-3-luc recombinant generated substantial luciferase activity ( $p < 0.05$ ), thus suggesting that this promoter maintains a relatively strong activity as well as tissue specificity when inserted in the viral genome. Evidently, the transgene expression observed with the ANGPTL-3-luc virus was lower than in cells infected with the HCMV-luc virus, in line with previous observations showing that viral, constitutive promoters such as CMV are usually stronger than tumour-specific promoters even in cancer cells [21]. In order to compare the strength of the ANGPTL-3 promoter with another tumour-specific promoter, we constructed a virus in which the luciferase was controlled by the E2F-1 promoter (E2F-1-luc virus) (Fig. 4A). As it can be seen in Figure 4C, luciferase expression driven by ANGPTL-3 promoter was comparable to that driven by E2F-1 promoter in Huh-7 cells. Neither promoter shows significant expression in normal hepatocytes, thus validating once more the hepatoma-specificity of the ANGPTL-3 promoter.

Finally, in order to validate our findings *in vivo*, we established human HCC xenografts in athymic mice by subcutaneous inoculation of Huh-7 cells. Tumours were injected with a single dose of the HCMV-luc, E2F-1-luc or ANGPTL-3-luc viruses at  $10^5$  pfu/mouse. Since the HSV-1 vectors used in this study are devoid of tumour specificity at the level of viral replication or infection, no tumour targeting can be expected. Therefore, transgene

expression in normal liver was studied in a separate set of tumor-free animals, in which the viruses were directly inoculated in the normal liver parenchyma at  $2 \times 10^5$  pfu/mouse. The luciferase activity was monitored by *in vivo* bioluminescence detection (Fig. 5). In agreement with our *in vitro* data, the ANGPTL-3 promoter was able to drive transgene expression in the tumours, although its peak activity was lower than in tumours infected with the HCMV-luc virus (Fig. 5B). The E2F-1-luc virus was stronger than ANGPTL-3-luc, but this difference was not statistically significant. All viruses showed a similar kinetics of luciferase expression in HCC xenografts, with a progressive increase during the first 3-5 days and a subsequent stabilisation. This is consistent with active replication of viruses *in vivo* [22]. The main difference between HCMV-luc and ANGPTL-3-luc was found in the transgene expression in healthy animals. The activity in mice inoculated with ANGPTL-3-luc was barely detectable, and remained very low during the whole observation period (Fig. 5C). In contrast, intrahepatic inoculation of the HCMV-luc virus caused a strong expression of luciferase in the liver of mice at early time points (Fig. 5A and C), indicating that the low expression of ANGPTL-3-luc was due to low transcriptional activity and not lack of infectivity of HSV-1 in hepatocytes. Interestingly, transgene expression of the HCMV-luc in the liver was transient, but the signal re-appeared 5 days later in the abdominal area, suggesting replication of the virus in other organs (Fig. 5A). Regarding the E2F-1-luc virus, the activity in normal liver was also lower than in the case of HCMV-luc, but some degree of re-activation in the abdominal area was observed at day 5, in contrast with ANGPTL-3-luc.

In order to study the behaviour of the viruses in the context of immunocompetent animals, we performed parallel experiments in Balb/c mice carrying subcutaneous tumours derived from the murine HCC cell line BNL 1MEA.7R.1 (BNL). Tumours were

inoculated with  $2 \times 10^7$  pfu of HCMV-luc or ANGPTL-3-luc viruses. In a separate set of healthy animals, the viruses were directly inoculated in the liver parenchyma at  $10^7$  pfu/mouse. Bioluminescence was monitored as previously described, and the results are presented in Figure 6. In contrast with the tumour xenografts in athymic mice, the expression of luciferase in syngeneic tumours did not experience amplification during the first days after inoculation, although replication of HSV-1 in BNL cells was demonstrated *in vitro* (data not shown). Apart from this difference, the relative strength of HCMV and ANGPTL-3 promoters was similar in BNL and Huh-7 tumours (about 100-fold difference). Regarding luciferase expression in normal liver, the ANGPTL-3-luc virus at  $10^7$  pfu showed a modest and transient expression, followed by a permanent disappearance of the signal. In contrast, the HCMV-luc virus recapitulated the same pattern observed in athymic mice, with an initial strong liver expression and further re-activation in abdominal organs.

## **Discussion**

Transcriptional targeting in cancer gene therapy and viral oncolysis is a powerful strategy to mediate both high selective expression of the transgene encoding cancer killing protein and tumour restriction of viral replication and lysis. In this study, we identified and thoroughly characterised novel hepatoma-specific promoters, which could preferentially be used either in virotherapy for the transcriptional retargeting of OVs to HCC or in gene therapy for the selective delivery of other therapeutic agents. So far, very few studies have been published concerning transcriptional targeting of oncolytic HSV-1 towards HCC, an approach that will enhance both safety and efficacy of these vectors through heightened specificity for the liver tumour. Miyatake and co-workers used the albumin promoter in order to drive expression of the viral ICP4 gene,

which is essential for viral replication, and achieve conditional replication of the HSV-1 virus in liver cells [23]. However, this virus could not be used for treating HCC because the albumin promoter is active in both tumour and normal tissues. More recently, an HSV-1 virus in which the virulence  $\gamma$ 34.5 gene is driven by the E2F-responsive B-myb promoter was shown to replicate in- and to selectively kill- hepatic metastasis of colorectal cancer, without damaging adjacent healthy hepatocytes [24]. However, this vector has not been tested in primary liver cancers. In another study, an AFP enhancer/albumin promoter/UL39 transcriptional cassette reintroduced UL39 gene expression in the G207 HSV-1 virus and improved viral cytotoxicity in the AFP-expressing Hep3B cells [25]. Moreover, HSV-1-based amplicon vectors containing albumin, alpha-fetoprotein or a chimeric ApoE enhancer/ $\alpha$ 1-antitrypsin promoter construct were reported recently [26]. However, AFP is only expressed in about half of the HCC in clinical practice, making the need for alternative choices for transcriptional targeting pressing.

This study was based on a cross-comparison of gene lists from published microarray studies of human HCC tumours and their non-tumour counterparts, with the help of modern bioinformatics, data mining and gene annotation tools. Genome-wide or small scale molecular profiling of HCC using high-throughput microarray techniques has been increasingly used to delineate the molecular pathogenesis of the disease and correlate major risk factors associated with HCC to specific molecular signatures [27]. However, variability of the biological samples coupled with inherent technical limitations, as well as the method of statistical analysis applied, all add up to remarkable variation between experiments. The lack of consistency in microarray analysis and the confusion arising from the increasing number of published data for cancer has been identified in literature

[28]. Meta-analysis and other integrative bioinformatics approaches have been used to provide more meaningful profiles from different studies [29], but they are difficult to grasp for the average experimenter. Hence, the challenge of our study was to derive a valid number of genes whose expression would be up-regulated in HBV- or HCV-associated HCC, from the long lists of the published microarray data. We tackled this problem by coupling our cross-comparison with the transcriptional profiler “Unigene” and selecting criteria that should enrich for a set of biological functions, such as enhanced gene expression in HCC as compared to normal tissue. Our methodology provided eight genes with high probability of specific-expression in HCC.

Our results were validated for tissue specificity by PCR analysis in hepatoma and non-liver cell lines, as well as in human liver specimens from surgical resections of HCC tumours and matched non-tumour tissue. It is known that chronic viral hepatitis B and in a lesser extent hepatitis C are the major aetiological factors for HCC, whereas exposure to alcohol, aflatoxin B1, and certain metabolic diseases such as haemochromatosis and  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency [1] are responsible for a small percentage of cases. Although the molecular signature of HBV- and HCV-induced HCC diverges since these viruses interact with the cellular genome in different ways [30], in the case of 7 out of 8 candidate genes in our study, the published microarray data corresponded to the results obtained from the HBV+ and HCV+ specimens. CYP2C8 showed no notable difference in mRNA expression however, this is a key enzyme that metabolises many clinically prescribed drugs, among which are prominent chemotherapeutics [31]. It is possible that such patient treatment may have induced this enzyme temporarily in some of the studies used in our analysis, so that its up-regulation was not directly relevant to HCC.

Subsequently, mRNA expression of the candidate genes was investigated under HSV-1 infection conditions. Two viral products, the virion host shut-off (vhs) protein and the immediate-early ICP27 gene product, have been shown to decrease cellular mRNAs via degradation and impairment of host cell splicing [11, 32]. Interestingly however, a time course of up to 8h post-infection revealed that wild type HSV-1 did not significantly alter mRNA expression of the genes under study, while ChIP assays with RNA polymerase II verified the mRNA profiles, thereby showing that the promoter activity of candidate genes was not affected by HSV-1 infection.

Based on the profiles obtained from the patient specimens, ANGPTL-3, ADH6 and ApoB were the most highly expressed genes in HCC, as compared to non-tumour tissue. Luciferase reporter constructs containing respective promoter sequences were therefore tested for liver specificity in hepatoma and non-liver cell lines. As expected, all three promoters showed high and hepatoma-specific activity. In addition, they remained active following super-infection of Huh-7 cells with wild type HSV-1 for at least 10h post-infection, in agreement with the ChIP analysis data. While the latter approach has been used to assess promoter activity under HSV-1 infection [33], several studies have reported that function of foreign promoters may be altered when inserted into certain loci of the HSV-1 viral genome [34]. An example of this is the cancer-specific human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter. It has been shown to be up-regulated in cancer cell lines by HSV-1 [32], but when inserted into the viral genome in front of interleukin 2, there was almost no cytokine production in glioma cells [34]. In contrast, when ANGPTL-3-luciferase transcriptional cassette was cloned in the HSV-1 genome within the intergenic region 20, high luciferase levels were produced only in

hepatoma cell lines, while an HCMV-luciferase virus generated higher, non-specific activity in all cell lines tested. E2F-1 promoter behaved similarly to ANGPTL-3, both in hepatoma-derived cell lines and in normal hepatocytes and WRL68 cells. However, while E2F-1 promoter drives luciferase activity also in other cancer cell lines, such as gliomas, and even in some rapidly proliferating non cancer cells, such as VERO cells, ANGPTL-3 showed significant promoter activity only in hepatoma-derived cells (data not shown).

*In vivo*, we confirmed that ANGPTL-3-luc expressed more luciferase in HCC xenografts than in normal liver. However, it was not possible to demonstrate a clear difference between ANGPTL-3-luc and HCMV-luc viruses in terms of tumour/liver transduction because the activity of HCMV-luc in the liver was transient, instead of showing progressive amplification over time, as observed in tumour xenografts. Therefore, it seems that murine hepatocytes are not fully permissive for HSV-1 replication, and this limits the peak luciferase activity detected *in vivo*. The same was observed for the murine liver tumours derived from BNL cells. However, the crucial difference observed between ANGPTL-3-luc and HCMV-luc was the lack of re-activation of transgene expression of ANGPTL-3-luc in any normal organ. In contrast, HCMV-luc showed a progressive increase in the luciferase signal in the abdominal area, corresponding to adrenal glands, uterus and ovaries. A detailed biodistribution study is currently ongoing, but this phenomenon seems to be a general characteristic of different HSV-1 strains (manuscript in preparation). Therefore, we believe that the delayed luciferase activity observed with HCMV-luc is due to replication of an initial amount of virus that reaches these organs via systemic circulation following intrahepatic injection. Taking into account that the ANGPTL-3-luc virus is not regulated at the level of replication, these

data suggest that the ANGPTL-3 promoter exerts an efficient restriction of transgene expression in a variety of normal tissues, which is more reliable than the inhibition observed with other tumour-specific promoters such as E2F-1.

In conclusion, this study identifies and methodically characterises novel cellular promoter sequences highly expressed in HCC, as compared to non-malignant liver tissue from patients. These promoters remain active when expressed from the viral genome, specifically in HCC-infected cells. Therefore, our results provide evidence towards their potential application for HCC-specific transcriptional targeting in viral-based gene therapy and oncolytic virotherapy with HSV-1-based viral vectors.

### **Acknowledgements**

This work was funded by the European Union, FP6 project THOVLEN-01864. We thank the French “Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC)” for supporting the doctoral studies of A.P.

### **Conflict of Interest**

The authors confirm that there are no conflicts of interest.

### **References**

1. Mazzanti R, Gramantieri L, Bolondi, L. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and clinical aspects. *Mol Aspects Med.* 2008;**29**:130–143.
2. Russell SJ, Peng KW. Viruses as anticancer drugs. *Trends Pharmacol Sci.* 2007;**28**:326-333.

3. Dorer DE, Nettelbeck DM. Targeting cancer by transcriptional control in cancer gene therapy and viral oncolysis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;**61**:554–571.
4. Ries SJ, Brandts CH. Oncolytic viruses for the treatment of cancer: current strategies and clinical trials. *Drug Discovery Today* 2004;**9**:759-768.
5. Chiocca EA. Oncolytic viruses. *Nat Rev Cancer* 2002;**2**:938-951.
6. Senzer NN, Kaufman HL, Amatruda T, *et al.* Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 2009;**27**:5763-71.
7. Hernandez-Alcoceba R, Pihalja M, Qian D, Clarke MF. New oncolytic adenoviruses with hypoxia- and estrogen receptor-regulated replication. *Hum Gene Ther.* 2002;**13**:1737-1750.
8. Johnson PA, Best MG, Friedmann T, Parris DS. Isolation of a herpes simplex virus type 1 mutant deleted for the essential UL42 Gene and characterization of its null phenotype. *J Virol.* 1991;**65**:700-10.
9. Bussey J, Kane D, Sunshine M, *et al.* MatchMiner: a tool for batch navigation among gene and gene product identifiers. *Genome Biol.* 2003;**4**:R27.
10. Shyamsundar R, Kim YH, Higgins JP, *et al.* A DNA microarray survey of gene expression in normal human tissues. *Genome Biol.* 2005;**6**:R22.
11. Pontius JU, Wagner L, Schuler GD. UniGene: a unified view of the transcriptome. In: *The NCBI Handbook*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information; 2003.
12. Frenster JH, Herstein PR. Gene de-repression. *N Engl J Med.* 1973;**288**:1224.
13. Karr BM, Read GS. The virion host shutoff function of herpes simplex virus degrades the 5' end of a target mRNA before the 3' end. *Virology* 1999;**264**:195-204.

14. Sandoval J, Rodríguez JL, Tur G, *et al.* RNAPol-ChIP: a novel application of chromatin immunoprecipitation to the analysis of real-time gene transcription. *Nucleic Acids Res.* 2004;**32**:e88.
15. Kardassis D, Hadzopoulou-Cladaras M, Ramji DP, *et al.* Characterisation of the promoter elements required for hepatic and intestinal transcription of the human apoB gene: definition of the DNA-binding site of a tissue-specific transcriptional factor. *Mol Cell Biol.* 1990;**10**:2653-9.
16. Fugier C, Tousaint J-J, Prieur X, *et al.* The lipoprotein lipase inhibitor ANGPTL-3 is negatively regulated by thyroid hormone. *J Biol Chem.* 2006;**281**:11553-9.
17. Zhi X, Chan EM, Edenberg HJ. Tissue-specific regulatory elements in the human alcohol dehydrogenase 6 gene. *DNA Cell Biol.* 2000;**19**:487-497.
18. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, *et al.* Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med.* 2005;**11**:791-6.
19. Sun D, Nassal M. Stable HepG2- and Huh7-based human hepatoma cell lines for efficient regulated expression of infectious hepatitis B virus. *J Hepatol.* 2006;**45**:636-645.
20. Gutiérrez-Ruiz MC, Bucio L, Souza V, *et al.* Expression of some hepatocyte-like functional properties of WRL-68 cells in culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1994;**30A**:366-371.
21. Hoffmann D, Wildner O. Restriction of adenoviral replication to the transcriptional intersection of two different promoters for colorectal and pancreatic cancer treatment. *Mol Cancer Ther.* 2006;**5**:374-381.
22. Bortolanza S, Bunuales M, Otano I, *et al.* Treatment of pancreatic cancer with an oncolytic adenovirus expressing interleukin-12 in Syrian hamsters. *Mol Ther.* 2009;**17**:614-622.
23. Miyatake S-I, Iyer A, Martuza RL, Rabkin SD. Transcriptional targeting of herpes simplex virus for cell-specific replication. *J Virol.* 1997;**71**:5124-5132.

24. Nakamura H, Kasuya H, Mullen JT, *et al.* Regulation of herpes simplex virus gamma(1)34.5 expression and oncolysis of diffuse liver metastases by Myb34.5. *Cancer* 2002; **1**;95:1171-81
25. Pin RH, Reinblatt M, Fong Y. Utilizing  $\alpha$ -fetoprotein expression to enhance oncolytic viral therapy in hepatocellular carcinoma. *Ann Surg.* 2004;**240**:659-666.
26. Lam PYP, Sia KC, Khong JH, *et al.* An efficient and safe herpes simplex virus type 1 amplicon vector for transcriptionally targeted therapy of human hepatocellular carcinoma. *Mol Ther.* 2007;**15**:1129-1136.
27. Midorikawa Y, Makuuchi M, Tang W, Aburatani H. Microarray-based analysis for hepatocellular carcinoma: from gene expression profiling to new challenges. *World J Gastroenterol.* 2007;**14**:1487-1492.
28. Roberts PC. Gene expression microarray data analysis demystified. *Biotechnol Annu Rev.* 2008;**14**:29-61.
29. Rhodes DR, Chinnaiyan AM. Integrative analysis of the cancer transcriptome. *Nat Genet.* 2005;**37**Suppl:S31-37.
30. Pang RWC, Joh JW, Johnson PJ, *et al.* Biology of hepatocellular carcinoma. *Ann Surgl Oncol.* 2008;**15**:962-971.
31. Ferguson SS, Chen Y, LeCluyse EL, *et al.* Human CYP2C8 is transcriptionally regulated by the nuclear receptors constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, glucocorticoid receptor, and hepatic nuclear factor 4 $\alpha$ . *Mol Pharmacol.* 2005;**68**:747-757.
32. Hardwicke MA, Sandri-Gouldin RM. The herpes simplex virus regulatory protein ICP27 contributes to the decrease in cellular mRNA levels during infection. *J Virol.* 1994;**68**:4797-4810.
33. Yang C-T, Song J, Bu X, *et al.* Herpes simplex virus type-1 infection upregulates cellular promoters and telomerase activity in both tumour and non-tumour human cells. *Gene Ther.* 2003;**10**:1494-1502.

34. Glass M, Söling A, Messerle M. Tumour-specific activity of cellular regulatory elements is down-regulated upon insertion into the herpes simplex virus genome. *J Neurovirol.* 2008;**14**:1-14.

## Tables

**Table 1. Candidate genes highly up-regulated in HCC identified from microarray analysis.**

<b>Gene Name</b>	<b>Accession Number</b>	<b>Gene Symbol</b>
glycogen synthase 2	NM_021957	GYS2
Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 7	NM_000354	SERPINA7
angiopoietin-like 3	NM_014495	ANGPTL-3
Inter-alpha (globulin) inhibitor H1	NM_002215	ITIH1
Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 8	NM_000770	CYP2C8
inter-alpha (globulin) inhibitor H2	NM_002216	ITIH2
Alcohol dehydrogenase 6 (class V)	NM_000672	ADH6
Apolipoprotein A-I	NM_000039	APOA1
alpha fetoprotein	NM_001134	AFP
Serine dehydratase	NM_006843	SDS
Apolipoprotein B (including Ag(x) antigen)	NM_000384	APOB
Fibrinogen beta chain	NM_005141	FGB
Inter-alpha (globulin) inhibitor H3	NM_002217	ITIH3
Inter-alpha (globulin) inhibitor H4 (plasma Kallikrein-sensitive glycoprotein)	NM_002218	ITIH4
Vitronectin	NM_000638	VTN
Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1	NM_000295	SERPINA1
Coagulation factor II (thrombin)	NM_000506	F2

## Figure Legends

### **Figure 1. Selection of candidate gene promoters based on known microarray data.**

**A.** Diagram of the methodology used to identify novel gene promoters for HSV-1 retargeting of HCC. **B.** The normal/tumour expression ratio for the candidate genes was calculated from Unigene EST expression profiles.

### **Figure 2. The candidate genes are specifically expressed in the liver and are not**

**down-regulated by HSV-1 infection.** mRNA expression profiles: **A.** In liver and non-liver cell lines, typical of at least three independent experiments. Hypoxia inducible factor 1-alpha (HIF-1 $\alpha$ ) was used as internal PCR control. **B.** In primary non-tumour (N) and tumour (C) cells from patients with HBV-related (HBV+) and HCV-related (HCV+) HCC. 28S rRNA was used as internal PCR control. **C.** Infection with wild type HSV-1 in Huh-7 cells. The interrupted line represents the non-infected control (n.i.). All values (mean  $\pm$  SD) were normalised against 28S rRNA and presented as a percentage of this. One-way ANOVA and student's t-tests between samples showed that differences between samples were not statistically significant ( $p > 0.05$ ). **D.** NPY mRNA expression in various cell lines. **E.** ChIP assays in mock-infected Huh-7 cells and 6hp.i. with wild-type HSV-1. Lanes 1 and 4 represent RNA polymerase II-enriched DNA, Lanes 2 and 5 non-specific IgG-enriched DNA and lanes 3 and 6 depict input DNA (PCR control). GAPDH and Negative control primers were used as positive and negative controls according to the manufacturer's instructions.

**Figure 3. Liver-specific promoter activity in cell lines of hepatic and non-hepatic origin and under viral infection.** Transient transfections with luciferase-reporter

plasmids containing **A.** ANGPTL-3 **B.** ADH6 and **C.** ApoB promoters. The Huh-7 value (mean±SD) was set as 1 and all other values are a fold ratio of this. **D.** Promoter activity in Huh-7 cells following infection HSV-1 24h post transfection (p.t.). The non-infected control at 24h was assigned as 100%. All other values (mean±SD) at post-infection (p.i.) intervals and at 34h p.t. are a percentage of this. Student's t-test showed that the difference between the non-infected control and the activity at 2hp.i. was not statistically significant ( $p>0.05$ ).

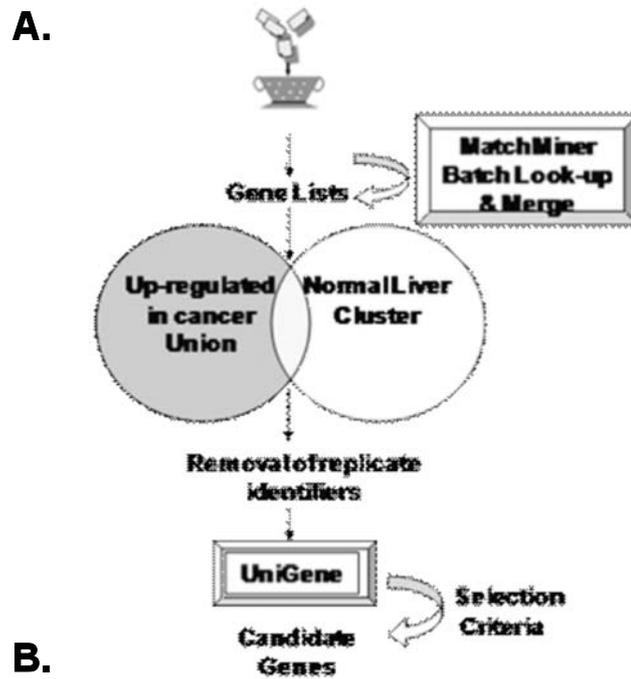
**Figure 4. Construction and evaluation of the ANGPTL-3-luc, E2F-1-luc and HCMV-luc viruses.** **A.** Schematic representation of the viral genomes **B** and **C**. Cells were infected with viruses and luciferase was measured at 16hp.i. Luciferase values were normalised to the amount of  $\beta$ -galactosidase activity. Student's t-test between samples showed that luciferase activity between the wild type-infected control (wt) and the ANGPTL-3-Luciferase virus was statistically significant (\* =  $p\leq 0.05$ ). The experiment was performed in triplicate. NH: normal hepatocytes.

**Figure 5. Specificity of the ANGPTL-3-luc virus in human HCC xenografts.** Subcutaneous Huh-7 tumour xenografts growing in the flank of *nu/nu* mice, were injected, intratumourally (IT), with a single dose of  $1\times 10^5$  pfu ANGPTL-3-luc (white circles, grey line), E2F-1-luc (black circles, black line) or HCMV-luc viruses (black squares, discontinuous line). Tumour-free animals were inoculated intrahepatically (IH) with  $2\times 10^5$  pfu of the viruses. **A.** Images of representative animals taken at days 1, 3, 5 and 13 following virus inoculation, are shown to indicate localisation of luciferase expression. In the artificial colour scale, red represents maximum and blue represents minimum intensities, but the picture is not intended for comparison of bioluminescence

because different times of exposure and acquisition modes were used. Average values of luciferase activity are shown for each group (n=5) at different days post-infection in the tumour (B) or the liver (C). In panel C, the values correspond to bioluminescence from the liver during the first 3 days, and from the abdominal area later on. The background luminescence is approximately  $2 \times 10^4$  photons/second. \*,  $p < 0.05$ .

**Figure 6. Specificity of the ANGPTL-3-luc virus in murine HCC tumors in syngeneic mice.** Subcutaneous BNL tumours growing in the flank of Balb/c mice, were injected, intratumourally (IT), with a single dose of  $2 \times 10^7$  pfu ANGPTL-3-luc (white circles, grey line) or HCMV-luc viruses (black squares, discontinuous line). Tumour-free animals were inoculated intrahepatically (IH) with  $10^7$  pfu of the viruses. **A.** Images of representative animals taken at days 1, 3 and 5 following virus inoculation, are shown to indicate localisation of luciferase expression. Average values of luciferase activity are shown for each group (n=5) at different days post-infection in the tumour (B) or the liver (C). In panel C, the values correspond to bioluminescence from the liver during the first 3 days, and from the abdominal area later on. The background luminescence is approximately  $2 \times 10^4$  photons/second. \*,  $p < 0.05$ .

Figure 1.



**B.**

	Tumour/Normal Expression Ratio (TPM)
ApoB	26
ITIH3	15
CYP2C8	14
ITIH1	9
AFP	6
ANGPTL-3	5
ADH6	5
FGB	5
VTN	4

Figure 2.

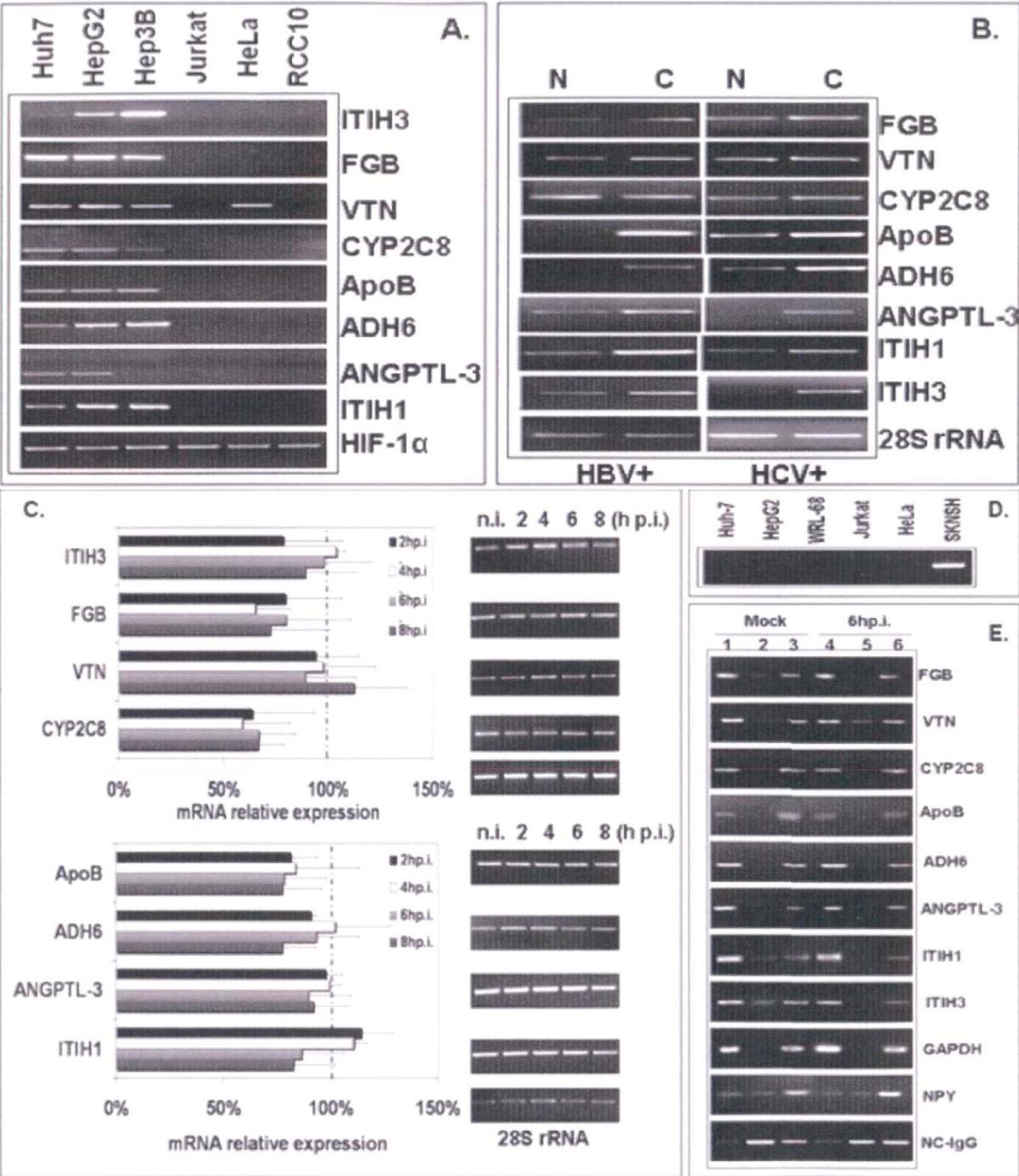


Figure 3.

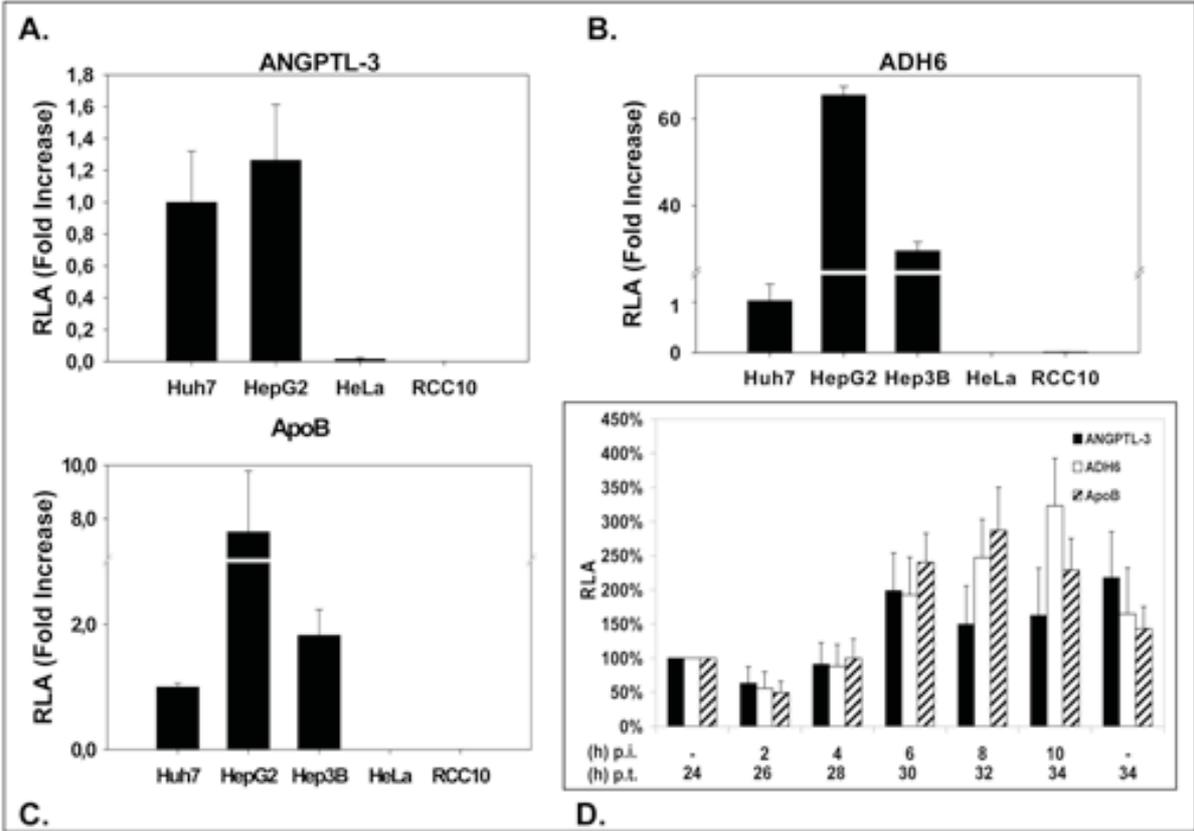


Figure 4.

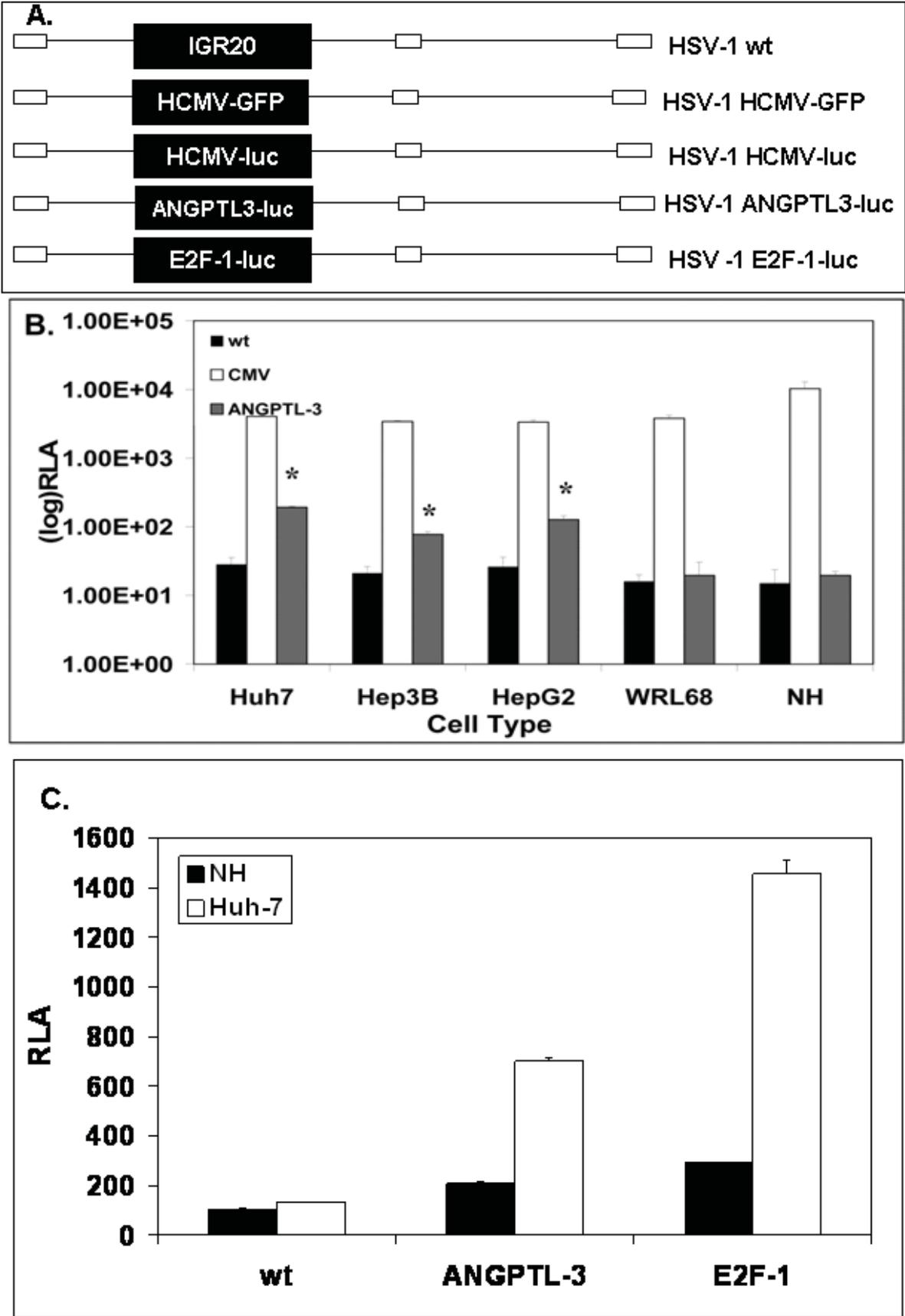


Figure 5.

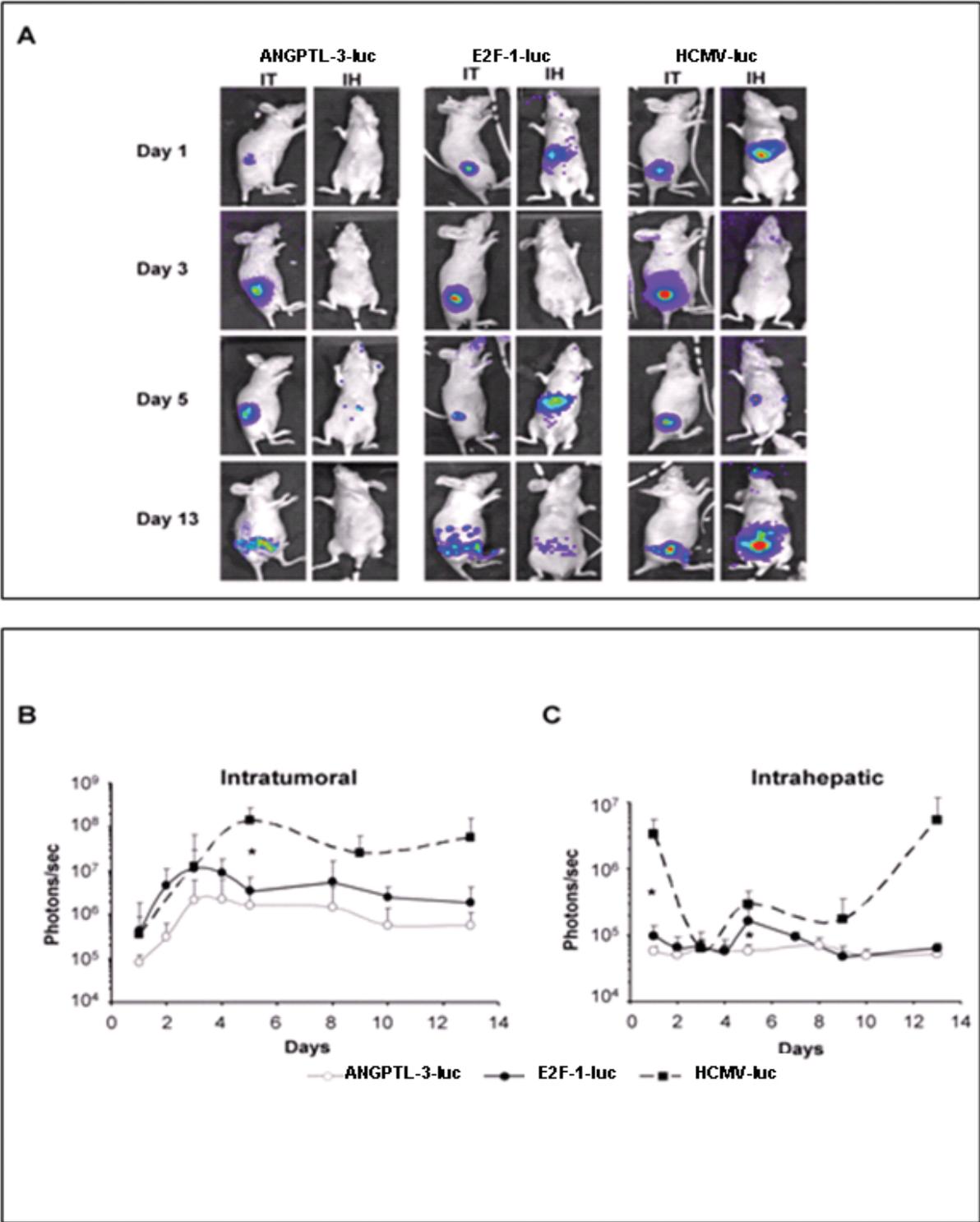
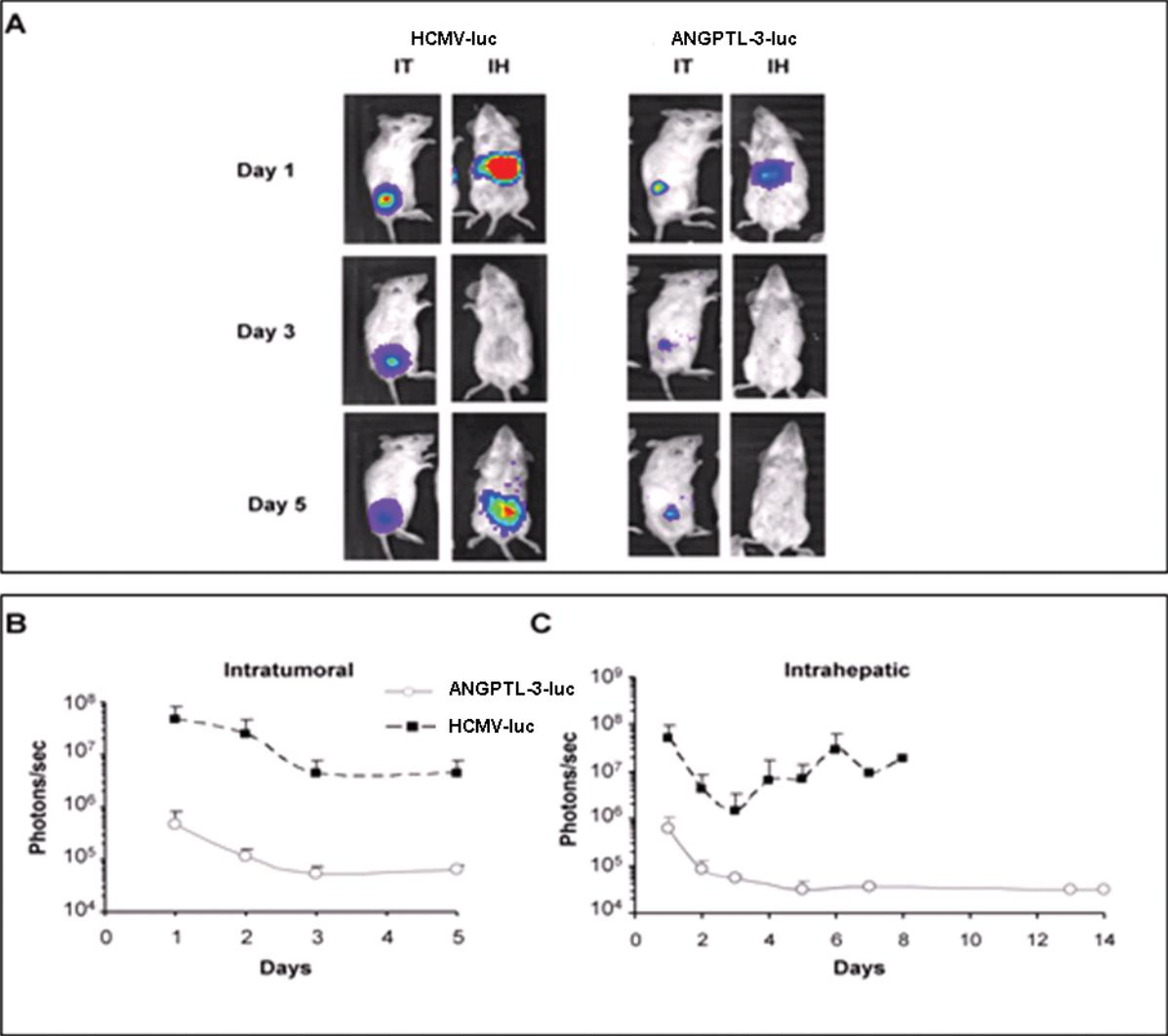


Figure 6.



## Supplementary Table. Microarray analysis references.

1. Mao H-J, Li H-N, Zhou X-M, *et al.* Monitoring microarray-based gene expression profile changes in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2005;**11**:2811-2816.
2. Goldenberg D, Ayesh S, Schneider T, *et al.* Analysis of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma using cDNA arrays. *Mol Carcinog.* 2002;**33**:113-124.
3. Tackels-Horne D, Goodman MD, Williams AJ, *et al.* Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma and metastatic liver tumours by oligonucleotide expression profiling. *Cancer* 2001;**92**:395-405.
4. Nam SW, Park JY, Ramasamy A, *et al.* Molecular changes from dysplastic nodule to hepatocellular carcinoma through gene expression profiling. *Hepatology* 2005;**42**:809-818.
5. Neo SY, Leow CK, Vega VB, *et al.* Identification of discriminators of hepatoma by gene expression profiling using a minimal dataset approach. *Hepatology* 2004;**39**:944-953.
6. Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, *et al.* Comparison of gene expression profiles between hepatitis B virus- and hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma by oligonucleotide microarray data on the basis of a supervised learning method. *Cancer Res.* 2002;**62**:3939-3944.
7. Li Y, Li Y, Tang R, *et al.* Discovery and analysis of hepatocellular carcinoma genes using cDNA microarrays. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2002;**128**:369-379.
8. Shirota Y, Kaneko S, Honda M, *et al.* Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma with cDNA microarrays. *Hepatology* 2001;**33**:832-840.
9. Okabe H, Satoh S, Kato T, *et al.* Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumour progression. *Cancer Res.* 2001;**61**:2129-2137.
10. Chen X, Cheung ST, So S, *et al.* Gene expression patterns in human liver cancers. *Mol Biol Cell.* 2002;**13**:1929-39.
11. Chung EJ, Sung YK, Farooq M, *et al.* Gene expression profile analysis in human hepatocellular carcinoma by cDNA microarray. *Mol Cells* 2002;**14**:382-387.
12. Crawley JJ, Furge KA. Identification of frequent cytogenetic aberrations in hepatocellular carcinoma using gene-expression microarray data. *Genome Biol.* 2002;**3**:research0075.
13. Qiu W, David D, Zhou B, *et al.* Down-regulation of growth arrest DNA damage-inducible gene 45beta expression is associated with hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol.* 2003;**162**:1961-1974.
14. Chen X, Higgins J, Cheung ST, *et al.* Montgomery K *et al.* Novel endothelial cell markers in hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol.* 2004;**17**:1198-1210.
15. Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, *et al.* Oligonucleotide microarray for prediction of early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Lancet* 2003;**361**:923-929.
16. Nagai H, Terada Y, Tajiri T, *et al.* Characterisation of liver-cirrhosis nodules by analysis of gene-expression profiles and patterns of allelic loss. *J Hum Genet.* 2004;**49**:246-255.
17. Anders RA, Yerian LM, Tretiakova M, *et al.* cDNA microarray analysis of macroregenerative and dysplastic nodules in end-stage hepatitis C virus-induced cirrhosis. *Am J Pathol.* 2003;**162**:991-1000.
18. Choi JK, Choi JY, Kim DG, *et al.* Integrative analysis of multiple gene expression profiles applied to liver cancer study. *FEBS Lett.* 2004;**565**:93-100.
19. Kurokawa Y, Matoba R, Takemasa I, *et al.* Molecular features of non-B, non-C hepatocellular carcinoma: a PCR-array gene expression profiling study. *J Hepatol.* 2003;**39**:1004-1012.
20. Xu XR, Huang J, Xu ZG, *et al.* Insight into hepatocellular carcinoma at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;**98**:15089-15094.
21. Lee D, Choi SW, Kim M, *et al.* Discovery of differentially expressed genes related to histological subtype of hepatocellular carcinoma. *Biotechnol Prog.* 2003;**19**:1011-1015.

## Supplemental Material

Gene Name	Sequence	Product Size (bp)	Tan (°C)	Cycles
ANGPTL-3 (Angiopoietin-like 3)	F:5'-TCTATCGCTGCAAACCAGTG-3' R:5'-CGGTCTGGAGAAGGTCTTTG-3'	293	60	26
CYP2C8 (Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 8)	F:5'- GCTGTAGTGCACGAGATCCA-3' R:5'- TTTCCTGCTGAGAAAGGCAT-3'	248	57	35
VTN (Vitronectin)	F:5'- CGAGGAGAAAAACAATGCCAC-3' R: 5'-CGAAATATCTCTGACGGCTTC-3'	499	57	35
ADH6 (Alcohol dehydrogenase 6 - class V)	F: 5'-ATGGTACCAGCAGGTTTACC-3' R:5'-ACGTCCAGATTTCCAATGGC-3'	448	57	30
ApoB (Apolipoprotein B)	F:5'-AGCCTTGCTGAAGAAAACCA-3' R:5'-CATGCCTTTGATGAGAGCAA-3'	364	56	24
FGB (Fibrinogen beta chain)	F: 5'-CTGTGGCCTACCAGGTGAAT-3' R: 5'-TCATGGTCCTGTTTTCTCCC-3'	248	57	20
ITIH3 (Inter-alpha - globulin - inhibitor H3)	F: 5'-TGTATAACCTGGGCTTTGGC-3' R:5'-GTGAAGGTCAGGTCGTTGGT-3'	328	60	28
ITIH1 (Inter-alpha – globulin - inhibitor H1)	F: 5' TTC TCC GCC TTT GGA GAT GC-3' R 5' GAA GTA CGT GCC GTC ATG CT-3'	301	58	30
HIF-1 $\alpha$ (Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ )	F:5'-CAGCTATTTGCGTGTGAGGA-3' R:5'-CCAAGCAGGTCATAGGTGGT-3'	470	60	20
28S rRNA	F:5'-TGA ACT ATG CTT GGG CAG GG-3' R:5'- AGC GCC ATC CAT TTT CAG GG-3'	500	55	14

**Table 1A**

<b>Gene Name</b>	<b>Sequence</b>
ADH6	F:5'-TGGATAATAAGAGGGGACCTG-3' R:5'-GGGAGATCCTGTAGCAACTTTC-3'
CYP2C8	F:5'-AATACCTTGGGCTCCAATCC-3' R:5'-CACCAGGACCACAAAAGGTT-3'
ApoB	F:5'-TAGAAAAGCAAACAGGTCA-3' R:5'-CTGGCGCCCGCCAGCAGC-3'
FGB	F:5'-CAGCCAACAAGTGAACCAAA-3' R:5'-TGTGGAAGCTCCAAGAAACC-3'
ITIH1	F:5'-TGTGTTAGGTTGATGCAAAAAGTC-3' R:5'-ACCGTCCATGCTCTAAGGCT-3'
ITIH3	F:5'-CAGGAATGAAGCCCCAAC-3' R:5'-AGCCGAAAGGGGCTTCTC-3'
ANGPTL-3	F:5'-CGTGCAAGTTAACACGGCT-3' R:5'-GAGGAACAATAAAAAGAAGGAGCTT-3'
VTN	F:5'-GGAGGTTGAGCAAACAGAGC-3' R:5'-AGCAGGGCCAGTATGAGAAG-3'
NPY	F:5'-CCGCTTCTTCAGGCAGTG-3' R:5'-CGGATGGGGTGCAGAGAG-3'

**Table 1B**

Reference	Specimen N+C (no)	Sex	Tumour Stage (no)	HBV status	HCV status	Array	Gene Number
(1)	20+20	u	u	u	u	In-house	1000
(2)	3+3	M	u(1),WD(1),MD(1)	-/+/-	+/-/-	Atlas of Human Cancer	588
(3)	6+8	M+F	III (MD), IV(WD)	u	u	Affymetrix-GeneChip	35000
(4)	20+30	M+F	PD(10),MD(10),WD(10)	+	-	In-house	10376
(5)	37+37	u	u	+	-	In-house	9000
(6)	Conly (56) Conly (56)	M+F	Mostly MD, WD,PD	+(14)	+(31)	Affymetrix-HuGeneFL	6000
(7)	3+12	M	u	u	u	In-house	12800
(8)	10+10	M+F	WD(2),MD(3)PD(5)	+(6)	+(9)	In-house	930
(9)	20+20	u	u	+(10)	+(10)	In-house	23040
(10)	74+102	u	u	u	u	In-house	17400
(11)	8+8	u	PD(4),WD(4)	u	u	In-house	3000
(12)	76+104	u	u	u	u	Stanford Microarray Database (Meta-analysis)	
(13)	4+4	u	u	u	u	Affymetrix - Hu95A Oligoprobe Gene Chip	12588
(14)	74+82	u	u	u	u	Stanford Microarray Database (Meta-analysis)	
(15)	Conly (33)	u	PD,MD	u	u	Affymetrix-HuGeneFL	6000
(16)	12+5	M	u	+	-	In-house	8448
(17)	9+9	u	u	u	+	Genomic Solutions - GeneMap Cancer	1152
(18)	53+80		u	+	-	In-house array and Meta-analysis	
(19)	17+20	M	WD(2),MD(9),PD(9)	-	-	In-house	3072
(20)	33+33	u	WD,MD	+	-	In-house and Atlas human cancer 1.2	12393 1176
(21)	10+10	u	PD(6),MD(4)	+(8)	-	In-house	3100

**Table 2**

**Table Legends**

**Table 1A. Sequences of mRNA specific primers and PCR conditions used for amplification of the candidate genes.**

**Table 1B. Sequences of gene specific primers used in ChIP analysis.**

**Table 2. Classification of clinical features of patient samples and microarray analysis details as illustrated in the studies used for bioinformatics analysis. Key:**

u=unknown, N+C (normal+cancerous), PD=poorly differentiated, MD=moderately differentiated, WD=well-differentiated, F=female, M=male.

### **References for Supplemental Material**

1.Mao H-J, Li H-N, Zhou X-M, Zhao J-L, Wan D-F. Monitoring microarray-based gene expression profile changes in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* (2005);11:2811-2816.

2.Goldenberg D, Ayesh S, Schneider T, Pappo O, Jurim O, Eid A et al. Analysis of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma using cDNA arrays. *Mol Carcinog* (2002);33:113-124.

3.Tackels-Horne D, Goodman MD, Williams AJ, Wilson DJ, Eskandari T, Vogt LM et al. Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma and

metastatic liver tumours by oligonucleotide expression profiling. *Cancer* (2001);92:395-405.

4.Nam SW, Park JY, Ramasamy A, Shevade S, Islam A, Long PM et al. Molecular changes from dysplastic nodule to hepatocellular carcinoma through gene expression profiling. *Hepatology* (2005);42:809-818.

5.Neo SY, Leow CK, Vega VB, Long PM, Islam AFM, Lai PBS et al. Identification of discriminators of hepatoma by gene expression profiling using a minimal dataset approach. *Hepatology* (2004);39:944–953.

6.Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, Mori N, Tamesa T, Okada T et al. Comparison of gene expression profiles between hepatitis B virus- and hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma by oligonucleotide microarray data on the basis of a supervised learning method. *Cancer Res* (2002);62:3939–3944.

7.Li Y, Li Y, Tang R, Xu H, Qiu M, Chen Q et al. Discovery and analysis of hepatocellular carcinoma genes using cDNA microarrays. *J Cancer Res Clin Oncol* (2002);128:369–379.

8.Shirota Y, Kaneko S, Honda M, Kawai HF, Kobayashi K. Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma with cDNA microarrays. *Hepatology* (2001);33:832-840.

9.Okabe H, Satoh S, Kato T, Kitahara O, Yanagawa R, Yamaoka Y et al. Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA

microarray:identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumour progression. *Cancer Res* (2001);61:2129-2137.

10.Chen X, Cheung ST, So S, Fan ST, Barry C, Higgins J et al. Gene expression patterns in human liver cancers. *Mol Biol Cell* (2002);13:1929-39.

11.Chung EJ, Sung YK, Farooq M, Kim Y, Im S, Tak WY et al. Gene expression profile analysis in human hepatocellular carcinoma by cDNA microarray. *Mol Cells* (2002);14:382-387.

12.Crawley JJ, Furge KA. Identification of frequent cytogenetic aberrations in hepatocellular carcinoma using gene-expression microarray data. *Genome Biol* (2002);3:research0075.

13.Qiu W, David D, Zhou B, Chu PG, Zhang B, Wu M et al. Down-regulation of growth arrest DNA damage-inducible gene 45beta expression is associated with hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* (2003);162:1961-1974.

14.Chen X, Higgins J, Cheung ST, Li R, Mason V, Montgomery K et al. Novel endothelial cell markers in hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol* (2004);17:1198-1210.

15.Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, Nishida M, Maeda Y, Mori N et al. Oligonucleotide microarray for prediction of early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Lancet* (2003);361:923-929.

16. Nagai H, Terada Y, Tajiri T, Yabe A, Onda M, Nagahata T et al. Characterisation of liver-cirrhosis nodules by analysis of gene-expression profiles and patterns of allelic loss. *J Hum Genet* (2004);49:246-255.
17. Anders RA, Yerian LM, Tretiakova M, Davison JM, Quigg RJ, Domer PH et al. cDNA microarray analysis of macroregenerative and dysplastic nodules in end-stage hepatitis C virus-induced cirrhosis. *Am J Pathol* (2003);162:991-1000.
18. Choi JK, Choi JY, Kim DG, Choi DW, Kim BY, Lee KH et al. Integrative analysis of multiple gene expression profiles applied to liver cancer study. *FEBS Lett* (2004);565:93-100.
19. Kurokawa Y, Matoba R, Takemasa I, Nakamori S, Tsujie M, Nagano H et al. Molecular features of non-B, non-C hepatocellular carcinoma: a PCR-array gene expression profiling study. *J Hepatol* (2003);39:1004-1012.
20. Xu XR, Huang J, Xu ZG, Qian BZ, Zhu ZD, Yan Q et al. Insight into hepatocellular carcinoma at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver. *Proc Natl Acad Sci USA* (2001);98:15089-15094.
21. Lee D, Choi SW, Kim M, Park JH, Kim M, Kim J et al. Discovery of differentially expressed genes related to histological subtype of hepatocellular carcinoma. *Biotechnol Prog* (2003);19:1011-1015.



## Références

1. Acehan, D., X. Jiang, D. G. Morgan, J. E. Heuser, X. Wang, and C. W. Akey. 2002. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 9:423-32.
2. Adams, J. M., and S. Cory. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281:1322-6.
3. Adusumilli, P. S., M. K. Chan, Y. S. Chun, M. Hezel, T. C. Chou, V. W. Rusch, and Y. Fong. 2006. Cisplatin-induced GADD34 upregulation potentiates oncolytic viral therapy in the treatment of malignant pleural mesothelioma. *Cancer Biol Ther* 5:48-53.
4. Adusumilli, P. S., B. M. Stiles, M. K. Chan, T. C. Chou, R. J. Wong, V. W. Rusch, and Y. Fong. 2005. Radiation therapy potentiates effective oncolytic viral therapy in the treatment of lung cancer. *Ann Thorac Surg* 80:409-16; discussion 416-7.
5. Aghi, M. K., and E. A. Chiocca. 2009. Phase I trial of oncolytic herpes virus G207 shows safety of multiple injections and documents viral replication. *Mol Ther* 17:8-9.
6. Amici, C., G. Belardo, A. Rossi, and M. G. Santoro. 2001. Activation of I kappa B kinase by herpes simplex virus type 1. A novel target for anti-herpetic therapy. *J Biol Chem* 276:28759-66.
7. Aravalli, R. N., S. Hu, T. N. Rowen, G. Gekker, and J. R. Lokensgard. 2006. Differential apoptotic signaling in primary glial cells infected with herpes simplex virus 1. *J Neurovirol* 12:501-10.
8. Arsura, M., and L. G. Cavin. 2005. Nuclear factor-kappaB and liver carcinogenesis. *Cancer Lett* 229:157-69.
9. Aubert, M., and J. A. Blaho. 1999. The herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP27 is required for the prevention of apoptosis in infected human cells. *J Virol* 73:2803-13.
10. Aubert, M., Z. Chen, R. Lang, C. H. Dang, C. Fowler, D. D. Sloan, and K. R. Jerome. 2008. The antiapoptotic herpes simplex virus glycoprotein J localizes to multiple cellular organelles and induces reactive oxygen species formation. *J Virol* 82:617-29.
11. Aubert, M., E. M. Krantz, and K. R. Jerome. 2006. Herpes simplex virus genes Us3, Us5, and Us12 differentially regulate cytotoxic T lymphocyte-induced cytotoxicity. *Viral Immunol* 19:391-408.
12. Aubert, M., J. O'Toole, and J. A. Blaho. 1999. Induction and prevention of apoptosis in human HEP-2 cells by herpes simplex virus type 1. *J Virol* 73:10359-70.
13. Aubert, M., L. E. Pomeranz, and J. A. Blaho. 2007. Herpes simplex virus blocks apoptosis by precluding mitochondrial cytochrome c release independent of caspase activation in infected human epithelial cells. *Apoptosis* 12:19-35.
14. Aubert, M., S. A. Rice, and J. A. Blaho. 2001. Accumulation of herpes simplex virus type 1 early and leaky-late proteins correlates with apoptosis prevention in infected human HEP-2 cells. *J Virol* 75:1013-30.

15. Azechi, H., N. Nishida, Y. Fukuda, T. Nishimura, M. Minata, H. Katsuma, M. Kuno, T. Ito, T. Komeda, R. Kita, R. Takahashi, and K. Nakao. 2001. Disruption of the p16/cyclin D1/retinoblastoma protein pathway in the majority of human hepatocellular carcinomas. *Oncology* 60:346-54.
16. Bataller, R., and D. A. Brenner. 2005. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115:209-18.
17. Benetti, L., J. Munger, and B. Roizman. 2003. The herpes simplex virus 1 US3 protein kinase blocks caspase-dependent double cleavage and activation of the proapoptotic protein BAD. *J Virol* 77:6567-73.
18. Benetti, L., and B. Roizman. 2004. Herpes simplex virus protein kinase US3 activates and functionally overlaps protein kinase A to block apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9411-6.
19. Benetti, L., and B. Roizman. 2006. Protein kinase B/Akt is present in activated form throughout the entire replicative cycle of deltaU(S)3 mutant virus but only at early times after infection with wild-type herpes simplex virus 1. *J Virol* 80:3341-8.
20. Bjerke, S. L., and R. J. Roller. 2006. Roles for herpes simplex virus type 1 UL34 and US3 proteins in disrupting the nuclear lamina during herpes simplex virus type 1 egress. *Virology* 347:261-76.
21. Blank, S. V., S. C. Rubin, G. Coukos, K. M. Amin, S. M. Albelda, and K. L. Molnar-Kimber. 2002. Replication-selective herpes simplex virus type 1 mutant therapy of cervical cancer is enhanced by low-dose radiation. *Hum Gene Ther* 13:627-39.
22. Borner, C. 2003. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* 39:615-47.
23. Boyault, S., D. S. Rickman, A. de Reynies, C. Balabaud, S. Rebouissou, E. Jeannot, A. Herault, J. Saric, J. Belghiti, D. Franco, P. Bioulac-Sage, P. Laurent-Puig, and J. Zucman-Rossi. 2007. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology* 45:42-52.
24. Budhu, A., M. Forgues, Q. H. Ye, H. L. Jia, P. He, K. A. Zanetti, U. S. Kammula, Y. Chen, L. X. Qin, Z. Y. Tang, and X. W. Wang. 2006. Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment. *Cancer Cell* 10:99-111.
25. Budhu, A., H. L. Jia, M. Forgues, C. G. Liu, D. Goldstein, A. Lam, K. A. Zanetti, Q. H. Ye, L. X. Qin, C. M. Croce, Z. Y. Tang, and X. W. Wang. 2008. Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 47:897-907.
26. Budhu, A., and X. W. Wang. 2006. The role of cytokines in hepatocellular carcinoma. *J Leukoc Biol* 80:1197-213.
27. Butterfield, L. H., A. Ribas, W. S. Meng, V. B. Dissette, S. Amarnani, H. T. Vu, E. Seja, K. Todd, J. A. Glaspy, W. H. McBride, and J. S. Economou. 2003. T-cell responses to HLA-A\*0201 immunodominant peptides derived from alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular cancer. *Clin Cancer Res* 9:5902-8.
28. Calin, G. A., C. D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich, and C. M. Croce. 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA

- genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15524-9.
29. Calle, E. E., C. Rodriguez, K. Walker-Thurmond, and M. J. Thun. 2003. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 348:1625-38.
  30. Campadelli-Fiume, G., M. Amasio, E. Avitabile, A. Cerretani, C. Forghieri, T. Gianni, and L. Menotti. 2007. The multipartite system that mediates entry of herpes simplex virus into the cell. *Rev Med Virol* 17:313-26.
  31. Capurro, M., I. R. Wanless, M. Sherman, G. Deboer, W. Shi, E. Miyoshi, and J. Filmus. 2003. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 125:89-97.
  32. Cartier, A., E. Broberg, T. Komai, M. Henriksson, and M. G. Masucci. 2003. The herpes simplex virus-1 Us3 protein kinase blocks CD8T cell lysis by preventing the cleavage of Bid by granzyme B. *Cell Death Differ* 10:1320-8.
  33. Cartier, A., T. Komai, and M. G. Masucci. 2003. The Us3 protein kinase of herpes simplex virus 1 blocks apoptosis and induces phosphorylation of the Bcl-2 family member Bad. *Exp Cell Res* 291:242-50.
  34. Cartier, A., and M. G. Masucci. 2004. Differential regulation of MHC class-I-restricted and unrestricted cytotoxicity by the Us3 protein kinase of herpes simplex virus-1. *Scand J Immunol* 60:592-9.
  35. Chambers, R., G. Y. Gillespie, L. Soroceanu, S. Andreansky, S. Chatterjee, J. Chou, B. Roizman, and R. J. Whitley. 1995. Comparison of genetically engineered herpes simplex viruses for the treatment of brain tumors in a scid mouse model of human malignant glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1411-5.
  36. Chang, H. Y., and X. Yang. 2000. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:821-46.
  37. Chen, G. G., R. L. Ho, J. Wong, K. F. Lee, and P. B. Lai. 2007. Single nucleotide polymorphism in the promoter region of human alpha-fetoprotein (AFP) gene and its significance in hepatocellular carcinoma (HCC). *Eur J Surg Oncol* 33:882-6.
  38. Chung, R. Y., Y. Saeki, and E. A. Chiocca. 1999. B-myb promoter retargeting of herpes simplex virus gamma34.5 gene-mediated virulence toward tumor and cycling cells. *J Virol* 73:7556-64.
  39. Chung, S. M., S. J. Advani, J. D. Bradley, Y. Kataoka, K. Vashistha, S. Y. Yan, J. M. Markert, G. Y. Gillespie, R. J. Whitley, B. Roizman, and R. R. Weichselbaum. 2002. The use of a genetically engineered herpes simplex virus (R7020) with ionizing radiation for experimental hepatoma. *Gene Ther* 9:75-80.
  40. Coelho, D., V. Holl, D. Weltin, T. Lacornerie, P. Magnenet, P. Dufour, and P. Bischoff. 2000. Caspase-3-like activity determines the type of cell death following ionizing radiation in MOLT-4 human leukaemia cells. *Br J Cancer* 83:642-9.
  41. Cohen, G. M. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 ( Pt 1):1-16.
  42. Cools, N., P. Ponsaerts, V. F. Van Tendeloo, and Z. N. Berneman. 2007. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *J Leukoc Biol* 82:1365-74.

43. Corey, L., and P. G. Spear. 1986. Infections with herpes simplex viruses (2). *N Engl J Med* 314:749-57.
44. Coukos, G., A. Makrigiannakis, E. H. Kang, D. Caparelli, I. Benjamin, L. R. Kaiser, S. C. Rubin, S. M. Albelda, and K. L. Molnar-Kimber. 1999. Use of carrier cells to deliver a replication-selective herpes simplex virus-1 mutant for the intraperitoneal therapy of epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 5:1523-37.
45. Coukos, G., A. Makrigiannakis, E. H. Kang, S. C. Rubin, S. M. Albelda, and K. L. Molnar-Kimber. 2000. Oncolytic herpes simplex virus-1 lacking ICP34.5 induces p53-independent death and is efficacious against chemotherapy-resistant ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 6:3342-53.
46. Cunningham, C., A. J. Davison, A. Dolan, M. C. Frame, D. J. McGeoch, D. M. Meredith, H. W. Moss, and A. C. Orr. 1992. The UL13 virion protein of herpes simplex virus type 1 is phosphorylated by a novel virus-induced protein kinase. *J Gen Virol* 73 ( Pt 2):303-11.
47. Dang, C. V., J. W. Kim, P. Gao, and J. Yustein. 2008. The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nat Rev Cancer* 8:51-6.
48. Darrasse-Jeze, G., A. S. Bergot, A. Durgeau, F. Billiard, B. L. Salomon, J. L. Cohen, B. Bellier, K. Podsypanina, and D. Klatzmann. 2009. Tumor emergence is sensed by self-specific CD44<sup>hi</sup> memory Tregs that create a dominant tolerogenic environment for tumors in mice. *J Clin Invest* 119:2648-62.
49. Dasgupta, A., and D. W. Wilson. 1999. ATP depletion blocks herpes simplex virus DNA packaging and capsid maturation. *J Virol* 73:2006-15.
50. Davido, D. J., D. A. Leib, and P. A. Schaffer. 2002. The cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine inhibits the transactivating activity and alters the posttranslational modification of herpes simplex virus type 1 ICP0. *J Virol* 76:1077-88.
51. Derakhshan, M., M. M. Willcocks, M. A. Salako, G. E. Kass, and M. J. Carter. 2006. Human herpesvirus 1 protein US3 induces an inhibition of mitochondrial electron transport. *J Gen Virol* 87:2155-9.
52. Deruelle, M. J., N. De Corte, J. Englebienne, H. J. Nauwynck, and H. W. Favoreel. Pseudorabies virus US3-mediated inhibition of apoptosis does not affect infectious virus production. *J Gen Virol* 91:1127-32.
53. Di Micco, R., M. Fumagalli, A. Cicalese, S. Piccinin, P. Gasparini, C. Luise, C. Schurra, M. Garre, P. G. Nuciforo, A. Bensimon, R. Maestro, P. G. Pelicci, and F. d'Adda di Fagagna. 2006. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444:638-42.
54. Durand, L. O., and B. Roizman. 2008. Role of cdk9 in the optimization of expression of the genes regulated by ICP22 of herpes simplex virus 1. *J Virol* 82:10591-9.
55. Ehmann, G. L., T. I. McLean, and S. L. Bachenheimer. 2000. Herpes simplex virus type 1 infection imposes a G(1)/S block in asynchronously growing cells and prevents G(1) entry in quiescent cells. *Virology* 267:335-49.
56. Enari, M., H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu, and S. Nagata. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391:43-50.

57. Fadok, V. A., D. L. Bratton, D. M. Rose, A. Pearson, R. A. Ezekewitz, and P. M. Henson. 2000. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405:85-90.
58. Farassati, F., A. D. Yang, and P. W. Lee. 2001. Oncogenes in Ras signalling pathway dictate host-cell permissiveness to herpes simplex virus 1. *Nat Cell Biol* 3:745-50.
59. Farazi, P. A., J. Glickman, S. Jiang, A. Yu, K. L. Rudolph, and R. A. DePinho. 2003. Differential impact of telomere dysfunction on initiation and progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 63:5021-7.
60. Fasullo, M., A. D. Burch, and A. Britton. 2009. Hypoxia enhances the replication of oncolytic herpes simplex virus in p53- breast cancer cells. *Cell Cycle* 8:2194-7.
61. Fu, X., F. Meng, L. Tao, A. Jin, and X. Zhang. 2003. A strict-late viral promoter is a strong tumor-specific promoter in the context of an oncolytic herpes simplex virus. *Gene Ther* 10:1458-64.
62. Galvan, V., and B. Roizman. 1998. Herpes simplex virus 1 induces and blocks apoptosis at multiple steps during infection and protects cells from exogenous inducers in a cell-type-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3931-6.
63. Gao, Q., S. J. Qiu, J. Fan, J. Zhou, X. Y. Wang, Y. S. Xiao, Y. Xu, Y. W. Li, and Z. Y. Tang. 2007. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol* 25:2586-93.
64. Gao, Y. W., Y. X. Chen, Z. M. Wang, J. Jin, X. Y. Li, D. Zhou le, Z. Huo, J. H. Zhou, and W. Chen. 2009. Increased expression of cyclooxygenase-2 and increased infiltration of regulatory T cells in tumors of patients with hepatocellular carcinoma. *Digestion* 79:169-76.
65. Gautier, I., J. Coppey, and C. Durieux. 2003. Early apoptosis-related changes triggered by HSV-1 in individual neuronlike cells. *Exp Cell Res* 289:174-83.
66. Gierasch, W. W., D. L. Zimmerman, S. L. Ward, T. K. Vanheyningen, J. D. Romine, and D. A. Leib. 2006. Construction and characterization of bacterial artificial chromosomes containing HSV-1 strains 17 and KOS. *J Virol Methods* 135:197-206.
67. Girard, M., E. Jacquemin, A. Munnich, S. Lyonnet, and A. Henrion-Caude. 2008. miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver. *J Hepatol* 48:648-56.
68. Glass, M., A. Soling, and M. Messerle. 2008. Tumor-specific activity of cellular regulatory elements is down-regulated upon insertion into the herpes simplex virus genome. *J Neurovirol*:1-14.
69. Goodkin, M. L., A. T. Ting, and J. A. Blaho. 2003. NF-kappaB is required for apoptosis prevention during herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol* 77:7261-80.
70. Gregory, D., D. Hargett, D. Holmes, E. Money, and S. L. Bachenheimer. 2004. Efficient replication by herpes simplex virus type 1 involves activation of the I kappa B kinase-I kappa B-p65 pathway. *J Virol* 78:13582-90.
71. Greten, T. F., L. A. Ormandy, A. Fikuart, B. Hochst, S. Henschen, M. Horning, M. P. Manns, and F. Korangy. Low-dose cyclophosphamide treatment impairs regulatory T cells and unmasks AFP-specific CD4+ T-cell responses in patients with advanced HCC. *J Immunother* 33:211-8.

72. Grimm, C. F., D. Ortmann, L. Mohr, S. Michalak, T. U. Krohne, S. Meckel, S. Eisele, J. Encke, H. E. Blum, and M. Geissler. 2000. Mouse alpha-fetoprotein-specific DNA-based immunotherapy of hepatocellular carcinoma leads to tumor regression in mice. *Gastroenterology* 119:1104-12.
73. Gripon, P., S. Rumin, S. Urban, J. Le Seyec, D. Glaise, I. Cannie, C. Guyomard, J. Lucas, C. Trepo, and C. Guguen-Guillouzo. 2002. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15655-60.
74. Guo, M., L. P. Song, Y. Jiang, W. Liu, Y. Yu, and G. Q. Chen. 2006. Hypoxia-mimetic agents desferrioxamine and cobalt chloride induce leukemic cell apoptosis through different hypoxia-inducible factor-1alpha independent mechanisms. *Apoptosis* 11:67-77.
75. Han, J., L. A. Goldstein, B. R. Gastman, A. Rabinovitz, G. Q. Wang, B. Fang, and H. Rabinowich. 2004. Differential involvement of Bax and Bak in TRAIL-mediated apoptosis of leukemic T cells. *Leukemia* 18:1671-80.
76. Han, J. Y., D. D. Sloan, M. Aubert, S. A. Miller, C. H. Dang, and K. R. Jerome. 2007. Apoptosis and antigen receptor function in T and B cells following exposure to herpes simplex virus. *Virology* 359:253-63.
77. Hansler, J., T. T. Wissniowski, D. Schuppan, A. Witte, T. Bernatik, E. G. Hahn, and D. Strobel. 2006. Activation and dramatically increased cytolytic activity of tumor specific T lymphocytes after radio-frequency ablation in patients with hepatocellular carcinoma and colorectal liver metastases. *World J Gastroenterol* 12:3716-21.
78. Hargett, D., T. McLean, and S. L. Bachenheimer. 2005. Herpes simplex virus ICP27 activation of stress kinases JNK and p38. *J Virol* 79:8348-60.
79. Hellums, E. K., J. M. Markert, J. N. Parker, B. He, B. Perbal, B. Roizman, R. J. Whitley, C. P. Langford, S. Bharara, and G. Y. Gillespie. 2005. Increased efficacy of an interleukin-12-secreting herpes simplex virus in a syngeneic intracranial murine glioma model. *Neuro Oncol* 7:213-24.
80. Hernandez-Alcoceba, R., M. Pihalja, D. Qian, and M. F. Clarke. 2002. New oncolytic adenoviruses with hypoxia- and estrogen receptor-regulated replication. *Hum Gene Ther* 13:1737-50.
81. Himeno, Y., Y. Fukuda, M. Hatanaka, and H. Imura. 1988. Expression of oncogenes in human liver disease. *Liver* 8:208-12.
82. Horikawa, I., P. L. Cable, C. Afshari, and J. C. Barrett. 1999. Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene. *Cancer Res* 59:826-30.
83. Hu, T. H., C. C. Huang, P. R. Lin, H. W. Chang, L. P. Ger, Y. W. Lin, C. S. Changchien, C. M. Lee, and M. H. Tai. 2003. Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 97:1929-40.
84. Ido, A., H. Uto, A. Moriuchi, K. Nagata, Y. Onaga, M. Onaga, T. Hori, S. Hirono, K. Hayashi, T. Tamaoki, and H. Tsubouchi. 2001. Gene therapy targeting for hepatocellular carcinoma: selective and enhanced suicide gene expression regulated by a hypoxia-inducible enhancer linked to a human alpha-fetoprotein promoter. *Cancer Res* 61:3016-21.
85. Iizuka, N., M. Oka, H. Yamada-Okabe, M. Nishida, Y. Maeda, N. Mori, T. Takao, T. Tamesa, A. Tangoku, H. Tabuchi, K. Hamada, H. Nakayama, H. Ishitsuka, T. Miyamoto, A. Hirabayashi, S. Uchimura, and Y. Hamamoto. 2003.

- Oligonucleotide microarray for prediction of early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Lancet* 361:923-9.
86. Imai, T., K. Sagou, J. Arai, and Y. Kawaguchi. Effects of phosphorylation of herpes simplex virus 1 envelope glycoprotein B by Us3 kinase in vivo and in vitro. *J Virol* 84:153-62.
  87. Israyelyan, A. H., J. M. Melancon, L. G. Lomax, I. Sehgal, C. Leuschner, M. T. Kearney, V. N. Chouljenko, A. Baghian, and K. G. Kousoulas. 2007. Effective treatment of human breast tumor in a mouse xenograft model with herpes simplex virus type 1 specifying the NV1020 genomic deletion and the gBsyn3 syncytial mutation enabling high viral replication and spread in breast cancer cells. *Hum Gene Ther* 18:457-73.
  88. Jerome, K. R., Z. Chen, R. Lang, M. R. Torres, J. Hofmeister, S. Smith, R. Fox, C. J. Froelich, and L. Corey. 2001. HSV and glycoprotein J inhibit caspase activation and apoptosis induced by granzyme B or Fas. *J Immunol* 167:3928-35.
  89. Jerome, K. R., R. Fox, Z. Chen, A. E. Sears, H. Lee, and L. Corey. 1999. Herpes simplex virus inhibits apoptosis through the action of two genes, Us5 and Us3. *J Virol* 73:8950-7.
  90. Jiang, J., Y. Gusev, I. Aderca, T. A. Mettler, D. M. Nagorney, D. J. Brackett, L. R. Roberts, and T. D. Schmittgen. 2008. Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival. *Clin Cancer Res* 14:419-27.
  91. Johnson, P. A., M. G. Best, T. Friedmann, and D. S. Parris. 1991. Isolation of a herpes simplex virus type 1 mutant deleted for the essential UL42 gene and characterization of its null phenotype. *J Virol* 65:700-10.
  92. Jones, E., M. Dahm-Vicker, A. K. Simon, A. Green, F. Powrie, V. Cerundolo, and A. Gallimore. 2002. Depletion of CD25+ regulatory cells results in suppression of melanoma growth and induction of autoreactivity in mice. *Cancer Immun* 2:1.
  93. Kamakura, M., A. Nawa, Y. Ushijima, F. Goshima, Y. Kawaguchi, F. Kikkawa, and Y. Nishiyama. 2008. Microarray analysis of transcriptional responses to infection by herpes simplex virus types 1 and 2 and their US3-deficient mutants. *Microbes Infect* 10:405-13.
  94. Kambara, H., H. Okano, E. A. Chiocca, and Y. Saeki. 2005. An oncolytic HSV-1 mutant expressing ICP34.5 under control of a nestin promoter increases survival of animals even when symptomatic from a brain tumor. *Cancer Res* 65:2832-9.
  95. Kaposi-Novak, P., L. Libbrecht, H. G. Woo, Y. H. Lee, N. C. Sears, C. Coulouarn, E. A. Conner, V. M. Factor, T. Roskams, and S. S. Thorgeirsson. 2009. Central role of c-Myc during malignant conversion in human hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 69:2775-82.
  96. Kasuya, H., Y. Nishiyama, S. Nomoto, F. Goshima, S. Takeda, I. Watanabe, N. Nomura, T. Shikano, T. Fujii, N. Kanazumi, and A. Nakao. 2007. Suitability of a US3-inactivated HSV mutant (L1BR1) as an oncolytic virus for pancreatic cancer therapy. *Cancer Gene Ther* 14:533-42.
  97. Kasuya, H., T. M. Pawlik, J. T. Mullen, J. M. Donahue, H. Nakamura, S. Chandrasekhar, H. Kawasaki, E. Choi, and K. K. Tanabe. 2004. Selectivity of an oncolytic herpes simplex virus for cells expressing the DF3/MUC1 antigen. *Cancer Res* 64:2561-7.

98. Kato, A., J. Arii, I. Shiratori, H. Akashi, H. Arase, and Y. Kawaguchi. 2009. Herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 phosphorylates viral envelope glycoprotein B and regulates its expression on the cell surface. *J Virol* 83:250-61.
99. Kato, A., M. Yamamoto, T. Ohno, H. Kodaira, Y. Nishiyama, and Y. Kawaguchi. 2005. Identification of proteins phosphorylated directly by the Us3 protein kinase encoded by herpes simplex virus 1. *J Virol* 79:9325-31.
100. Kato, A., M. Yamamoto, T. Ohno, M. Tanaka, T. Sata, Y. Nishiyama, and Y. Kawaguchi. 2006. Herpes simplex virus 1-encoded protein kinase UL13 phosphorylates viral Us3 protein kinase and regulates nuclear localization of viral envelopment factors UL34 and UL31. *J Virol* 80:1476-86.
101. Katoh, H., H. Ojima, A. Kokubu, S. Saito, T. Kondo, T. Kosuge, F. Hosoda, I. Imoto, J. Inazawa, S. Hirohashi, and T. Shibata. 2007. Genetically distinct and clinically relevant classification of hepatocellular carcinoma: putative therapeutic targets. *Gastroenterology* 133:1475-86.
102. Katsura, T., S. Iwai, Y. Ota, H. Shimizu, K. Ikuta, and Y. Yura. 2009. The effects of trichostatin A on the oncolytic ability of herpes simplex virus for oral squamous cell carcinoma cells. *Cancer Gene Ther* 16:237-45.
103. Kawakami, Y., M. Kitamoto, T. Nakanishi, W. Yasui, E. Tahara, J. Nakayama, F. Ishikawa, H. Tahara, T. Ide, and G. Kajiyama. 2000. Immunohistochemical detection of human telomerase reverse transcriptase in human liver tissues. *Oncogene* 19:3888-93.
104. Kelly, K., P. Brader, A. Rein, J. P. Shah, R. J. Wong, Y. Fong, and Z. Gil. 2008. Attenuated multimitated herpes simplex virus-1 effectively treats prostate carcinomas with neural invasion while preserving nerve function. *FASEB J* 22:1839-48.
105. Kemeny, N., K. Brown, A. Covey, T. Kim, A. Bhargava, L. Brody, B. Guilfoyle, N. P. Haag, M. Karrasch, B. Glasschroeder, A. Knoll, G. Getrajdman, K. J. Kowal, W. R. Jarnagin, and Y. Fong. 2006. Phase I, open-label, dose-escalating study of a genetically engineered herpes simplex virus, NV1020, in subjects with metastatic colorectal carcinoma to the liver. *Hum Gene Ther* 17:1214-24.
106. Kharbanda, S., S. Saxena, K. Yoshida, P. Pandey, M. Kaneki, Q. Wang, K. Cheng, Y. N. Chen, A. Campbell, T. Sudha, Z. M. Yuan, J. Narula, R. Weichselbaum, C. Nalin, and D. Kufe. 2000. Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. *J Biol Chem* 275:322-7.
107. Kobayashi, N., N. Hiraoka, W. Yamagami, H. Ojima, Y. Kanai, T. Kosuge, A. Nakajima, and S. Hirohashi. 2007. FOXP3+ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis. *Clin Cancer Res* 13:902-11.
108. Kolodkin-Gal, D., Y. Edden, Z. Hartshtark, L. Ilan, A. Khalaileh, A. J. Pikarsky, E. Pikarsky, S. D. Rabkin, A. Panet, and G. Zamir. 2009. Herpes simplex virus delivery to orthotopic rectal carcinoma results in an efficient and selective antitumor effect. *Gene Ther* 16:905-15.
109. Koyama, A. H., and Y. Miwa. 1997. Suppression of apoptotic DNA fragmentation in herpes simplex virus type 1-infected cells. *J Virol* 71:2567-71.

110. Kuroda, T., S. D. Rabkin, and R. L. Martuza. 2006. Effective treatment of tumors with strong beta-catenin/T-cell factor activity by transcriptionally targeted oncolytic herpes simplex virus vector. *Cancer Res* 66:10127-35.
111. Ladeiro, Y., G. Couchy, C. Balabaud, P. Bioulac-Sage, L. Pelletier, S. Rebouissou, and J. Zucman-Rossi. 2008. MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations. *Hepatology* 47:1955-63.
112. Lazarevich, N. L. 2000. Molecular mechanisms of alpha-fetoprotein gene expression. *Biochemistry (Mosc)* 65:117-33.
113. Leach, N., S. L. Bjerke, D. K. Christensen, J. M. Bouchard, F. Mou, R. Park, J. Baines, T. Haraguchi, and R. J. Roller. 2007. Emerin is hyperphosphorylated and redistributed in herpes simplex virus type 1-infected cells in a manner dependent on both UL34 and US3. *J Virol* 81:10792-803.
114. Lechel, A., H. Holstege, Y. Begus, A. Schienke, K. Kamino, U. Lehmann, S. Kubicka, P. Schirmacher, J. Jonkers, and K. L. Rudolph. 2007. Telomerase deletion limits progression of p53-mutant hepatocellular carcinoma with short telomeres in chronic liver disease. *Gastroenterology* 132:1465-75.
115. Lee, C. Y., L. X. Bu, P. S. Rennie, and W. W. Jia. 2007. An HSV-1 amplicon system for prostate-specific expression of ICP4 to complement oncolytic viral replication for in vitro and in vivo treatment of prostate cancer cells. *Cancer Gene Ther* 14:652-60.
116. Lee, C. Y., P. S. Rennie, and W. W. Jia. 2009. MicroRNA regulation of oncolytic herpes simplex virus-1 for selective killing of prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 15:5126-35.
117. Lee, J. S., I. S. Chu, J. Heo, D. F. Calvisi, Z. Sun, T. Roskams, A. Durnez, A. J. Demetris, and S. S. Thorgeirsson. 2004. Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology* 40:667-76.
118. Lee, W. C., H. C. Wang, C. F. Hung, P. F. Huang, C. R. Lia, and M. F. Chen. 2005. Vaccination of advanced hepatocellular carcinoma patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells: a clinical trial. *J Immunother* 28:496-504.
119. Leib, D. A., M. A. Machalek, B. R. Williams, R. H. Silverman, and H. W. Virgin. 2000. Specific phenotypic restoration of an attenuated virus by knockout of a host resistance gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6097-101.
120. Leopardi, R., and B. Roizman. 1996. The herpes simplex virus major regulatory protein ICP4 blocks apoptosis induced by the virus or by hyperthermia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9583-7.
121. Li, H., H. Zhu, C. J. Xu, and J. Yuan. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491-501.
122. Liang, L., and B. Roizman. 2008. Expression of gamma interferon-dependent genes is blocked independently by virion host shutoff RNase and by US3 protein kinase. *J Virol* 82:4688-96.
123. Lilley, C. E., C. T. Carson, A. R. Muotri, F. H. Gage, and M. D. Weitzman. 2005. DNA repair proteins affect the lifecycle of herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5844-9.
124. Liu, B. L., M. Robinson, Z. Q. Han, R. H. Branston, C. English, P. Reay, Y. McGrath, S. K. Thomas, M. Thornton, P. Bullock, C. A. Love, and R. S. Coffin.

2003. ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. *Gene Ther* 10:292-303.
125. Liu, T. C., E. Galanis, and D. Kirn. 2007. Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress. *Nat Clin Pract Oncol* 4:101-17.
126. Liu, T. C., and D. Kirn. 2005. Viruses with deletions in antiapoptotic genes as potential oncolytic agents. *Oncogene* 24:6069-79.
127. Liu, T. C., H. Wakimoto, R. L. Martuza, and S. D. Rabkin. 2007. Herpes simplex virus Us3(-) mutant as oncolytic strategy and synergizes with phosphatidylinositol 3-kinase-Akt targeting molecular therapeutics. *Clin Cancer Res* 13:5897-902.
128. Liu, X., K. Fitzgerald, E. Kurt-Jones, R. Finberg, and D. M. Knipe. 2008. Herpesvirus tegument protein activates NF-kappaB signaling through the TRAF6 adaptor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:11335-9.
129. Llovet, J. M., Y. Chen, E. Wurmbach, S. Roayaie, M. I. Fiel, M. Schwartz, S. N. Thung, G. Khitrov, W. Zhang, A. Villanueva, C. Battiston, V. Mazzaferro, J. Bruix, S. Waxman, and S. L. Friedman. 2006. A molecular signature to discriminate dysplastic nodules from early hepatocellular carcinoma in HCV cirrhosis. *Gastroenterology* 131:1758-67.
130. Llovet, J. M., S. Ricci, V. Mazzaferro, P. Hilgard, E. Gane, J. F. Blanc, A. C. de Oliveira, A. Santoro, J. L. Raoul, A. Forner, M. Schwartz, C. Porta, S. Zeuzem, L. Bolondi, T. F. Greten, P. R. Galle, J. F. Seitz, I. Borbath, D. Haussinger, T. Giannaris, M. Shan, M. Moscovici, D. Voliotis, and J. Bruix. 2008. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 359:378-90.
131. Lu, J., G. Getz, E. A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B. L. Ebert, R. H. Mak, A. A. Ferrando, J. R. Downing, T. Jacks, H. R. Horvitz, and T. R. Golub. 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435:834-8.
132. Maeda, S., H. Kamata, J. L. Luo, H. Leffert, and M. Karin. 2005. IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell* 121:977-90.
133. Mahller, Y. Y., B. Sakthivel, W. H. Baird, B. J. Aronow, Y. H. Hsu, T. P. Cripe, and R. Mehrian-Shai. 2008. Molecular analysis of human cancer cells infected by an oncolytic HSV-1 reveals multiple upregulated cellular genes and a role for SOCS1 in virus replication. *Cancer Gene Ther* 15:733-41.
134. Markert, J. M., M. D. Medlock, S. D. Rabkin, G. Y. Gillespie, T. Todo, W. D. Hunter, C. A. Palmer, F. Feigenbaum, C. Tornatore, F. Tufaro, and R. L. Martuza. 2000. Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther* 7:867-74.
135. Martelli, A. M., A. Cappellini, P. L. Tazzari, A. M. Billi, C. Tassi, F. Ricci, F. Fala, and R. Conte. 2004. Caspase-9 is the upstream caspase activated by 8-methoxypsoralen and ultraviolet-A radiation treatment of Jurkat T leukemia cells and normal T lymphocytes. *Haematologica* 89:471-9.
136. Martin, J., F. Magnino, K. Schmidt, A. C. Piguat, J. S. Lee, D. Semela, M. V. St-Pierre, A. Ziemiecki, D. Cassio, C. Brenner, S. S. Thorgeirsson, and J. F. Dufour. 2006. Hint2, a mitochondrial apoptotic sensitizer down-regulated in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 130:2179-88.

137. Mauad, T. H., C. M. van Nieuwkerk, K. P. Dingemans, J. J. Smit, A. H. Schinkel, R. G. Notenboom, M. A. van den Bergh Weerman, R. P. Verkruijsen, A. K. Groen, R. P. Oude Elferink, and et al. 1994. Mice with homozygous disruption of the *mdr2* P-glycoprotein gene. A novel animal model for studies of nonsuppurative inflammatory cholangitis and hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol* 145:1237-45.
138. Mazure, N. M., C. Chauvet, B. Bois-Joyeux, M. A. Bernard, H. Nacer-Cherif, and J. L. Danan. 2002. Repression of alpha-fetoprotein gene expression under hypoxic conditions in human hepatoma cells: characterization of a negative hypoxia response element that mediates opposite effects of hypoxia inducible factor-1 and c-Myc. *Cancer Res* 62:1158-65.
139. Mazzaferro, V., E. Regalia, R. Doci, S. Andreola, A. Pulvirenti, F. Bozzetti, F. Montalto, M. Ammatuna, A. Morabito, and L. Gennari. 1996. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 334:693-9.
140. Medici, M. A., M. T. Sciortino, D. Perri, C. Amici, E. Avitabile, M. Ciotti, E. Balestrieri, E. De Smaele, G. Franzoso, and A. Mastino. 2003. Protection by herpes simplex virus glycoprotein D against Fas-mediated apoptosis: role of nuclear factor kappaB. *J Biol Chem* 278:36059-67.
141. Meng, F., R. Henson, H. Wehbe-Janek, K. Ghoshal, S. T. Jacob, and T. Patel. 2007. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 133:647-58.
142. Mezhir, J. J., S. J. Advani, K. D. Smith, T. E. Darga, A. P. Poon, H. Schmidt, M. C. Posner, B. Roizman, and R. R. Weichselbaum. 2005. Ionizing radiation activates late herpes simplex virus 1 promoters via the p38 pathway in tumors treated with oncolytic viruses. *Cancer Res* 65:9479-84.
143. Mirkes, P. E. 2002. 2001 Warkany lecture: to die or not to die, the role of apoptosis in normal and abnormal mammalian development. *Teratology* 65:228-39.
144. Mizukoshi, E., Y. Nakamoto, Y. Marukawa, K. Arai, T. Yamashita, H. Tsuji, K. Kuzushima, M. Takiguchi, and S. Kaneko. 2006. Cytotoxic T cell responses to human telomerase reverse transcriptase in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 43:1284-94.
145. Mohr, I. 2005. To replicate or not to replicate: achieving selective oncolytic virus replication in cancer cells through translational control. *Oncogene* 24:7697-709.
146. Mohr, I., D. Sternberg, S. Ward, D. Leib, M. Mulvey, and Y. Gluzman. 2001. A herpes simplex virus type 1 gamma34.5 second-site suppressor mutant that exhibits enhanced growth in cultured glioblastoma cells is severely attenuated in animals. *J Virol* 75:5189-96.
147. Montgomery, R. I., M. S. Warner, B. J. Lum, and P. G. Spear. 1996. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 87:427-36.
148. Mori, I., F. Goshima, T. Koshizuka, N. Koide, T. Sugiyama, T. Yoshida, T. Yokochi, Y. Kimura, and Y. Nishiyama. 2003. The US3 protein kinase of herpes simplex virus attenuates the activation of the c-Jun N-terminal protein kinase signal transduction pathway in infected piriform cortex neurons of C57BL/6 mice. *Neurosci Lett* 351:201-5.

149. Morris, J. B., H. Hofemeister, and P. O'Hare. 2007. Herpes simplex virus infection induces phosphorylation and delocalization of emerin, a key inner nuclear membrane protein. *J Virol* 81:4429-37.
150. Mou, F., T. Forest, and J. D. Baines. 2007. US3 of herpes simplex virus type 1 encodes a promiscuous protein kinase that phosphorylates and alters localization of lamin A/C in infected cells. *J Virol* 81:6459-70.
151. Mou, F., E. Wills, and J. D. Baines. 2009. Phosphorylation of the U(L)31 protein of herpes simplex virus 1 by the U(S)3-encoded kinase regulates localization of the nuclear envelopment complex and egress of nucleocapsids. *J Virol* 83:5181-91.
152. Mou, F., E. G. Wills, R. Park, and J. D. Baines. 2008. Effects of lamin A/C, lamin B1, and viral US3 kinase activity on viral infectivity, virion egress, and the targeting of herpes simplex virus U(L)34-encoded protein to the inner nuclear membrane. *J Virol* 82:8094-104.
153. Mullen, J. T., H. Kasuya, S. S. Yoon, N. M. Carroll, T. M. Pawlik, S. Chandrasekhar, H. Nakamura, J. M. Donahue, and K. K. Tanabe. 2002. Regulation of herpes simplex virus 1 replication using tumor-associated promoters. *Ann Surg* 236:502-12; discussion 512-3.
154. Munger, J., A. V. Chee, and B. Roizman. 2001. The U(S)3 protein kinase blocks apoptosis induced by the d120 mutant of herpes simplex virus 1 at a premitochondrial stage. *J Virol* 75:5491-7.
155. Nakamura, H., H. Kasuya, J. T. Mullen, S. S. Yoon, T. M. Pawlik, S. Chandrasekhar, J. M. Donahue, E. A. Chiocca, R. Y. Chung, and K. K. Tanabe. 2002. Regulation of herpes simplex virus gamma(1)34.5 expression and oncolysis of diffuse liver metastases by Myb34.5. *J Clin Invest* 109:871-82.
156. Naugler, W. E., and M. Karin. 2008. NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms. *Curr Opin Genet Dev* 18:19-26.
157. Nawa, A., N. Nozawa, F. Goshima, T. Nagasaka, F. Kikkawa, Y. Niwa, T. Nakanishi, K. Kuzuya, and Y. Nishiyama. 2003. Oncolytic viral therapy for human ovarian cancer using a novel replication-competent herpes simplex virus type I mutant in a mouse model. *Gynecol Oncol* 91:81-8.
158. Nguyen, M. L., R. M. Kraft, and J. A. Blaho. 2005. African green monkey kidney Vero cells require de novo protein synthesis for efficient herpes simplex virus 1-dependent apoptosis. *Virology* 336:274-90.
159. Nicholson, D. W., and N. A. Thornberry. 1997. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22:299-306.
160. Ogata, H., T. Kobayashi, T. Chinen, H. Takaki, T. Sanada, Y. Minoda, K. Koga, G. Takaesu, Y. Maehara, M. Iida, and A. Yoshimura. 2006. Deletion of the SOCS3 gene in liver parenchymal cells promotes hepatitis-induced hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* 131:179-93.
161. Ogg, P. D., P. J. McDonnell, B. J. Ryckman, C. M. Knudson, and R. J. Roller. 2004. The HSV-1 Us3 protein kinase is sufficient to block apoptosis induced by overexpression of a variety of Bcl-2 family members. *Virology* 319:212-24.
162. Orlinick, J. R., A. K. Vaishnav, and K. B. Elkon. 1999. Structure and function of Fas/Fas ligand. *Int Rev Immunol* 18:293-308.
163. Otsuki, A., A. Patel, K. Kasai, M. Suzuki, K. Kurozumi, E. A. Chiocca, and Y. Saeki. 2008. Histone deacetylase inhibitors augment antitumor efficacy of herpes-based oncolytic viruses. *Mol Ther* 16:1546-55.

164. Pahl, H. L. 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18:6853-66.
165. Paradis, V., N. Youssef, D. Dargere, N. Ba, F. Bonvoust, J. Deschatrette, and P. Bedossa. 2001. Replicative senescence in normal liver, chronic hepatitis C, and hepatocellular carcinomas. *Hum Pathol* 32:327-32.
166. Park, R., and J. D. Baines. 2006. Herpes simplex virus type 1 infection induces activation and recruitment of protein kinase C to the nuclear membrane and increased phosphorylation of lamin B. *J Virol* 80:494-504.
167. Parker, J. N., G. Y. Gillespie, C. E. Love, S. Randall, R. J. Whitley, and J. M. Markert. 2000. Engineered herpes simplex virus expressing IL-12 in the treatment of experimental murine brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2208-13.
168. Pasiaka, T. J., T. Baas, V. S. Carter, S. C. Proll, M. G. Katze, and D. A. Leib. 2006. Functional genomic analysis of herpes simplex virus type 1 counteraction of the host innate response. *J Virol* 80:7600-12.
169. Passer, B. J., C. L. Wu, S. Wu, S. D. Rabkin, and R. L. Martuza. 2009. Analysis of genetically engineered oncolytic herpes simplex viruses in human prostate cancer organotypic cultures. *Gene Ther* 16:1477-82.
170. Patel, A., J. Hanson, T. I. McLean, J. Olgiate, M. Hilton, W. E. Miller, and S. L. Bachenheimer. 1998. Herpes simplex type 1 induction of persistent NF-kappa B nuclear translocation increases the efficiency of virus replication. *Virology* 247:212-22.
171. Paterson, T., and R. D. Everett. 1990. A prominent serine-rich region in Vmw175, the major transcriptional regulator protein of herpes simplex virus type 1, is not essential for virus growth in tissue culture. *J Gen Virol* 71 ( Pt 8):1775-83.
172. Peri, P., R. K. Mattila, H. Kantola, E. Broberg, H. S. Karttunen, M. Waris, T. Vuorinen, and V. Hukkanen. 2008. Herpes simplex virus type 1 Us3 gene deletion influences toll-like receptor responses in cultured monocytic cells. *Virol J* 5:140.
173. Piroozmand, A., A. H. Koyama, Y. Shimada, M. Fujita, T. Arakawa, and A. Adachi. 2004. Role of Us3 gene of herpes simplex virus type 1 for resistance to interferon. *Int J Mol Med* 14:641-5.
174. Prieto, J. 2008. Inflammation, HCC and sex: IL-6 in the centre of the triangle. *J Hepatol* 48:380-1.
175. Purves, F. C., D. Spector, and B. Roizman. 1991. The herpes simplex virus 1 protein kinase encoded by the US3 gene mediates posttranslational modification of the phosphoprotein encoded by the UL34 gene. *J Virol* 65:5757-64.
176. Purves, F. C., D. Spector, and B. Roizman. 1992. UL34, the target of the herpes simplex virus U(S)3 protein kinase, is a membrane protein which in its unphosphorylated state associates with novel phosphoproteins. *J Virol* 66:4295-303.
177. Reinblatt, M., R. H. Pin, H. J. Federoff, and Y. Fong. 2004. Utilizing tumor hypoxia to enhance oncolytic viral therapy in colorectal metastases. *Ann Surg* 239:892-9; discussion 899-902.
178. Reynolds, A. E., B. J. Ryckman, J. D. Baines, Y. Zhou, L. Liang, and R. J. Roller. 2001. U(L)31 and U(L)34 proteins of herpes simplex virus type 1 form a

- complex that accumulates at the nuclear rim and is required for envelopment of nucleocapsids. *J Virol* 75:8803-17.
179. Reynolds, A. E., E. G. Wills, R. J. Roller, B. J. Ryckman, and J. D. Baines. 2002. Ultrastructural localization of the herpes simplex virus type 1 UL31, UL34, and US3 proteins suggests specific roles in primary envelopment and egress of nucleocapsids. *J Virol* 76:8939-52.
  180. Roizman, B., and D. M. Knipe. 2001. Herpes simplex viruses and their replication, p. 2399-2460. *In* D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*. Lippincott, Williams and Wilkin, Philadelphia, PA.
  181. Roncalli, M., P. Bianchi, B. Bruni, L. Laghi, A. Destro, S. Di Gioia, L. Gennari, M. Tommasini, A. Malesci, and G. Coggi. 2002. Methylation framework of cell cycle gene inhibitors in cirrhosis and associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 36:427-32.
  182. Ryckman, B. J., and R. J. Roller. 2004. Herpes simplex virus type 1 primary envelopment: UL34 protein modification and the US3-UL34 catalytic relationship. *J Virol* 78:399-412.
  183. Sagou, K., T. Imai, H. Sagara, M. Uema, and Y. Kawaguchi. 2009. Regulation of the catalytic activity of herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 by autophosphorylation and its role in pathogenesis. *J Virol* 83:5773-83.
  184. Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, T. Nomura, and M. Ono. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133:775-87.
  185. Sanfilippo, C. M., F. N. Chirimuuta, and J. A. Blaho. 2004. Herpes simplex virus type 1 immediate-early gene expression is required for the induction of apoptosis in human epithelial HEP-2 cells. *J Virol* 78:224-39.
  186. Santamaria, E., M. I. Mora, E. Carro-Roldan, M. Molina, J. Fernandez-Irigoyen, P. Marconi, R. Manservigi, A. Greco, A. L. Epstein, J. Prieto, R. Hernandez-Alcoceba, and F. J. Corrales. 2009. Identification of replication-competent HSV-1 Cgal+ strain targets in a mouse model of human hepatocarcinoma xenograft. *J Proteomics* 73:153-60.
  187. Sarinella, F., A. Calistri, P. Sette, G. Palu, and C. Parolin. 2006. Oncolysis of pancreatic tumour cells by a gamma34.5-deleted HSV-1 does not rely upon Ras-activation, but on the PI 3-kinase pathway. *Gene Ther* 13:1080-7.
  188. Schang, L. M., A. Bantly, and P. A. Schaffer. 2002. Explant-induced reactivation of herpes simplex virus occurs in neurons expressing nuclear cdk2 and cdk4. *J Virol* 76:7724-35.
  189. Sciortino, M. T., M. A. Medici, F. Marino-Merlo, D. Zaccaria, M. Giuffre-Cuculitto, A. Venuti, S. Grelli, P. Bramanti, and A. Mastino. 2008. Involvement of gD/HVEM interaction in NF- $\kappa$ B-dependent inhibition of apoptosis by HSV-1 gD. *Biochem Pharmacol* 76:1522-32.
  190. Senzer, N. N., H. L. Kaufman, T. Amatruda, M. Nemunaitis, T. Reid, G. Daniels, R. Gonzalez, J. Glaspy, E. Whitman, K. Harrington, H. Goldsweig, T. Marshall, C. Love, R. Coffin, and J. J. Nemunaitis. 2009. Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 27:5763-71.
  191. Shibolet, O., R. Alper, L. Zlotogarov, B. Thalenfeld, D. Engelhardt, E. Rabbani, and Y. Ilan. 2003. NKT and CD8 lymphocytes mediate suppression of hepatocellular carcinoma growth via tumor antigen-pulsed dendritic cells. *Int J Cancer* 106:236-43.

192. Shimoda, R., M. Nagashima, M. Sakamoto, N. Yamaguchi, S. Hirohashi, J. Yokota, and H. Kasai. 1994. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in human livers with chronic hepatitis. *Cancer Res* 54:3171-2.
193. Shyamsundar, R., Y. H. Kim, J. P. Higgins, K. Montgomery, M. Jorden, A. Sethuraman, M. van de Rijn, D. Botstein, P. O. Brown, and J. R. Pollack. 2005. A DNA microarray survey of gene expression in normal human tissues. *Genome Biol* 6:R22.
194. Si, M. L., S. Zhu, H. Wu, Z. Lu, F. Wu, and Y. Y. Mo. 2007. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* 26:2799-803.
195. Sloan, D. D., G. Zahariadis, C. M. Posavad, N. T. Pate, S. J. Kussick, and K. R. Jerome. 2003. CTL are inactivated by herpes simplex virus-infected cells expressing a viral protein kinase. *J Immunol* 171:6733-41.
196. Smith, K. D., M. Y. Shao, M. C. Posner, and R. R. Weichselbaum. 2007. Tumor genotype determines susceptibility to oncolytic herpes simplex virus mutants: strategies for clinical application. *Future Oncol* 3:545-56.
197. Song, T. J., D. P. Eisenberg, P. S. Adusumilli, M. Hezel, and Y. Fong. 2006. Oncolytic herpes viral therapy is effective in the treatment of hepatocellular carcinoma cell lines. *J Gastrointest Surg* 10:532-42.
198. Spear, M. A., F. Sun, D. J. Eling, E. Gilpin, T. J. Kipps, E. A. Chiocca, and M. Bouvet. 2000. Cytotoxicity, apoptosis, and viral replication in tumor cells treated with oncolytic ribonucleotide reductase-defective herpes simplex type 1 virus (hrR3) combined with ionizing radiation. *Cancer Gene Ther* 7:1051-9.
199. Stanziale, S. F., H. Petrowsky, J. K. Joe, G. D. Roberts, J. S. Zager, N. J. Gusani, L. Ben-Porat, M. Gonen, and Y. Fong. 2002. Ionizing radiation potentiates the antitumor efficacy of oncolytic herpes simplex virus G207 by upregulating ribonucleotide reductase. *Surgery* 132:353-9.
200. Su, Y. H., X. Zhang, B. Aiamkitsumrit, Q. Tang, G. Maul, N. W. Fraser, and T. M. Block. 2006. The stability of herpes simplex virus type I genomes in infected Vero cells undergoing viral induced apoptosis. *J Neurovirol* 12:375-86.
201. Taddeo, B., T. R. Luo, W. Zhang, and B. Roizman. 2003. Activation of NF-kappaB in cells productively infected with HSV-1 depends on activated protein kinase R and plays no apparent role in blocking apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12408-13.
202. Tamori, A., T. Hayashi, M. Shinzaki, S. Kobayashi, S. Iwai, M. Enomoto, H. Morikawa, H. Sakaguchi, S. Shiomi, S. Takemura, S. Kubo, and N. Kawada. 2009. Frequent detection of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma of patients with sustained virologic response for hepatitis C virus. *J Med Virol* 81:1009-14.
203. Tandon, P., and G. Garcia-Tsao. 2009. Prognostic indicators in hepatocellular carcinoma: a systematic review of 72 studies. *Liver Int* 29:502-10.
204. Taneja, S., J. MacGregor, S. Markus, S. Ha, and I. Mohr. 2001. Enhanced antitumor efficacy of a herpes simplex virus mutant isolated by genetic selection in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8804-8.
205. Thimme, R., M. Neagu, T. Boettler, C. Neumann-Haefelin, N. Kersting, M. Geissler, F. Makowiec, R. Obermaier, U. T. Hopt, H. E. Blum, and H. C.

- Spangenberg. 2008. Comprehensive analysis of the alpha-fetoprotein-specific CD8+ T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 48:1821-33.
206. Thomas, M. 2009. Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 44 Suppl 19:136-41.
207. Thomas, S., R. S. Coffin, P. Watts, G. Gough, and D. S. Latchman. 1998. The TAATGARAT motif in the herpes simplex virus immediate-early gene promoters can confer both positive and negative responses to cellular octamer-binding proteins when it is located within the viral genome. *J Virol* 72:3495-500.
208. Thompson, J. F., L. S. Hayes, and D. B. Lloyd. 1991. Modulation of firefly luciferase stability and impact on studies of gene regulation. *Gene* 103:171-7.
209. Thornberry, N. A. 1998. Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem Biol* 5:R97-103.
210. Tomizawa, M., L. Yu, A. Wada, T. Tamaoki, K. Kadomatsu, T. Muramatsu, S. Matsubara, K. Watanabe, M. Ebara, H. Saisho, S. Sakiyama, and M. Tagawa. 2003. A promoter region of the midkine gene that is frequently expressed in human hepatocellular carcinoma can activate a suicide gene as effectively as the alpha-fetoprotein promoter. *Br J Cancer* 89:1086-90.
211. Toyoizumi, T., R. Mick, A. E. Abbas, E. H. Kang, L. R. Kaiser, and K. L. Molnar-Kimber. 1999. Combined therapy with chemotherapeutic agents and herpes simplex virus type 1 ICP34.5 mutant (HSV-1716) in human non-small cell lung cancer. *Hum Gene Ther* 10:3013-29.
212. Tyminski, E., S. Leroy, K. Terada, D. M. Finkelstein, J. L. Hyatt, M. K. Danks, P. M. Potter, Y. Saeki, and E. A. Chiocca. 2005. Brain tumor oncolysis with replication-conditional herpes simplex virus type 1 expressing the prodrug-activating genes, CYP2B1 and secreted human intestinal carboxylesterase, in combination with cyclophosphamide and irinotecan. *Cancer Res* 65:6850-7.
213. Umbach, J. L., M. F. Kramer, I. Jurak, H. W. Karnowski, D. M. Coen, and B. R. Cullen. 2008. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* 454:780-3.
214. Unitt, E., A. Marshall, W. Gelson, S. M. Rushbrook, S. Davies, S. L. Vowler, L. S. Morris, N. Coleman, and G. J. Alexander. 2006. Tumour lymphocytic infiltrate and recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *J Hepatol* 45:246-53.
215. Unitt, E., S. M. Rushbrook, A. Marshall, S. Davies, P. Gibbs, L. S. Morris, N. Coleman, and G. J. Alexander. 2005. Compromised lymphocytes infiltrate hepatocellular carcinoma: the role of T-regulatory cells. *Hepatology* 41:722-30.
216. Veerapong, J., K. A. Bickenbach, M. Y. Shao, K. D. Smith, M. C. Posner, B. Roizman, and R. R. Weichselbaum. 2007. Systemic delivery of (gamma1)34.5-deleted herpes simplex virus-1 selectively targets and treats distant human xenograft tumors that express high MEK activity. *Cancer Res* 67:8301-6.
217. Vermeulen, K., D. R. Van Bockstaele, and Z. N. Berneman. 2005. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol* 84:627-39.

218. **Viguiet, M., F. Lemaitre, O. Verola, M. S. Cho, G. Gorochov, L. Dubertret, H. Bachelez, P. Kourilsky, and L. Ferradini. 2004. Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* 173:1444-53.**
219. **Villanueva, A., D. Y. Chiang, P. Newell, J. Peix, S. Thung, C. Alsinet, V. Tovar, S. Roayaie, B. Minguez, M. Sole, C. Battiston, S. Van Laarhoven, M. I. Fiel, A. Di Feo, Y. Hoshida, S. Yea, S. Toffanin, A. Ramos, J. A. Martignetti, V. Mazzaferro, J. Bruix, S. Waxman, M. Schwartz, M. Meyerson, S. L. Friedman, and J. M. Llovet. 2008. Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 135:1972-83, 1983 e1-11.**
220. **Villanueva, A., P. Newell, D. Y. Chiang, S. L. Friedman, and J. M. Llovet. 2007. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 27:55-76.**
221. **Wada, Y., O. Nakashima, R. Kutami, O. Yamamoto, and M. Kojiro. 1998. Clinicopathological study on hepatocellular carcinoma with lymphocytic infiltration. *Hepatology* 27:407-14.**
222. **Wakimoto, H., S. Kesari, C. J. Farrell, W. T. Curry, Jr., C. Zaupa, M. Aghi, T. Kuroda, A. Stemmer-Rachamimov, K. Shah, T. C. Liu, D. S. Jeyaretna, J. Debasitis, J. Pruszk, R. L. Martuza, and S. D. Rabkin. 2009. Human glioblastoma-derived cancer stem cells: establishment of invasive glioma models and treatment with oncolytic herpes simplex virus vectors. *Cancer Res* 69:3472-81.**
223. **Walro, D. G., and K. S. Rosenthal. 1997. The antiviral xanthate compound D609 inhibits herpes simplex virus type 1 replication and protein phosphorylation. *Antiviral Res* 36:63-72.**
224. **Warming, S., N. Costantino, D. L. Court, N. A. Jenkins, and N. G. Copeland. 2005. Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic Acids Res* 33:e36.**
225. **Watanabe, K., A. Saito, and T. Tamaoki. 1987. Cell-specific enhancer activity in a far upstream region of the human alpha-fetoprotein gene. *J Biol Chem* 262:4812-8.**
226. **Wei, N., and X. W. Deng. 2003. The COP9 signalosome. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:261-86.**
227. **Whitlow, Z., and T. M. Kristie. 2009. Recruitment of the transcriptional coactivator HCF-1 to viral immediate-early promoters during initiation of reactivation from latency of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 83:9591-5.**
228. **Wisner, T. W., C. C. Wright, A. Kato, Y. Kawaguchi, F. Mou, J. D. Baines, R. J. Roller, and D. C. Johnson. 2009. Herpesvirus gB-induced fusion between the virion envelope and outer nuclear membrane during virus egress is regulated by the viral US3 kinase. *J Virol* 83:3115-26.**
229. **Woo, E. Y., H. Yeh, C. S. Chu, K. Schlienger, R. G. Carroll, J. L. Riley, L. R. Kaiser, and C. H. June. 2002. Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol* 168:4272-6.**
230. **Wu, X. Z., G. R. Xie, and D. Chen. 2007. Hypoxia and hepatocellular carcinoma: The therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 22:1178-82.**

231. Yamamoto, S., L. A. Deckter, K. Kasai, E. A. Chiocca, and Y. Saeki. 2006. Imaging immediate-early and strict-late promoter activity during oncolytic herpes simplex virus type 1 infection and replication in tumors. *Gene Ther* 13:1731-6.
232. Yamamura, H., H. Yoshikawa, and K. Takahashi. 2003. Aberrant methylation and silencing of the calponin gene in human sarcoma cells. *Anticancer Res* 23:107-14.
233. Yamashita, T., A. Budhu, M. Forgues, and X. W. Wang. 2007. Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 67:10831-9.
234. Yamauchi, K., S. M. Akbar, N. Horiike, K. Michitaka, and M. Onji. 2003. Increased serum levels of macrophage inflammatory protein-3alpha in hepatocellular carcinoma: relationship with clinical factors and prognostic importance during therapy. *Int J Mol Med* 11:601-5.
235. Ye, Q. H., L. X. Qin, M. Forgues, P. He, J. W. Kim, A. C. Peng, R. Simon, Y. Li, A. I. Robles, Y. Chen, Z. C. Ma, Z. Q. Wu, S. L. Ye, Y. K. Liu, Z. Y. Tang, and X. W. Wang. 2003. Predicting hepatitis B virus-positive metastatic hepatocellular carcinomas using gene expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 9:416-23.
236. Yin, X. M. 2000. Signal transduction mediated by Bid, a pro-death Bcl-2 family proteins, connects the death receptor and mitochondria apoptosis pathways. *Cell Res* 10:161-7.
237. Yoo, H. Y., C. H. Patt, J. F. Geschwind, and P. J. Thuluvath. 2003. The outcome of liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the United States between 1988 and 2001: 5-year survival has improved significantly with time. *J Clin Oncol* 21:4329-35.
238. Yuan, J., and H. R. Horvitz. 2004. A first insight into the molecular mechanisms of apoptosis. *Cell* 116:S53-6, 1 p following S59.
239. Yuen, M. F., P. C. Wu, V. C. Lai, J. Y. Lau, and C. L. Lai. 2001. Expression of c-Myc, c-Fos, and c-jun in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 91:106-12.
240. Zachos, G., M. Koffa, C. M. Preston, J. B. Clements, and J. Conner. 2001. Herpes simplex virus type 1 blocks the apoptotic host cell defense mechanisms that target Bcl-2 and manipulates activation of p38 mitogen-activated protein kinase to improve viral replication. *J Virol* 75:2710-28.
241. Zaupa, C., V. Revol-Guyot, and A. L. Epstein. 2003. Improved packaging system for generation of high-level noncytotoxic HSV-1 amplicon vectors using Cre-loxP site-specific recombination to delete the packaging signals of defective helper genomes. *Hum Gene Ther* 14:1049-63.
242. Zhou, G., V. Galvan, G. Campadelli-Fiume, and B. Roizman. 2000. Glycoprotein D or J delivered in trans blocks apoptosis in SK-N-SH cells induced by a herpes simplex virus 1 mutant lacking intact genes expressing both glycoproteins. *J Virol* 74:11782-91.
243. Zhou, G., and B. Roizman. 2000. Wild-type herpes simplex virus 1 blocks programmed cell death and release of cytochrome c but not the translocation of mitochondrial apoptosis-inducing factor to the nuclei of human embryonic lung fibroblasts. *J Virol* 74:9048-53.
244. Zou, H., Y. Li, X. Liu, and X. Wang. 1999. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274:11549-56.

