

Université de Montréal

L'étude des effets des estrogènes sur la virothérapie du cancer du sein

Par
Stamatios Paradisis

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise

en Microbiologie et Immunologie

Aout 2022

© Stamatios Paradisis, 2022

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé

L'étude des effets des estrogènes sur la virothérapie du cancer du sein

Présenté par

Stamatios Paradisis

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Guy Lemay

Président-rapporteur

Marie-Claude Bourgeois-Daigneault

Directrice de recherche

Gerardo Ferbeyre

Membre du jury

Résumé et mots-clés

Le cancer est une maladie qui touche des millions de personnes et ne discrimine pas. La forme de cancer la plus répandue chez les femmes au Canada est le cancer du sein et la deuxième cause de décès par le cancer chez cette population. Les traitements dépendent de plusieurs facteurs dont le stade du cancer, la ménopause, le statut des récepteurs hormonaux et du récepteur HER2 du cancer, etc. Les traitements qui existent sont la chirurgie suivie par la radio- et/ou chimiothérapie et l'hormonothérapie.

Malgré les nombreuses études et les avancées dans les traitements pour différents cancers, plusieurs patients ont des cancers du sein qui sont réfractaires aux traitements disponibles. Une alternative naissante est l'utilisation de virus oncolytiques, c'est-à-dire des virus qui ciblent spécifiquement les cellules cancéreuses et laissent intactes les cellules saines. Malheureusement, certains cancers demeurent réfractaires aux traitements avec virus oncolytiques. Ceci nous amène donc à regarder plus en détail des facteurs de l'environnement tumoral qui pourraient prédire la susceptibilité virale et engendrer des résultats positifs. C'est dans cette perspective que nous avons découvert que l'estrogène, précisément l'estradiol, rend les cellules cancéreuses qui en expriment le récepteur plus sensible au virus oncolytique VSV (virus de la stomatite vésiculaire). Cependant, nous ignorons toujours si d'autres hormones peuvent également moduler l'action de VO. Nous émettons donc l'hypothèse que, comme l'estrogène, d'autres hormones vont affecter l'efficacité des VO et qu'il serait possible de manipuler ces interactions pour améliorer la réponse au traitement. Notre étude nous permettra de concevoir des stratégies thérapeutiques améliorées pour les patients atteints du cancer du sein.

L'importance de cette étude est que jusqu'à présent l'impact des hormones sur l'efficacité des virus oncolytiques reste un sujet inexploré. Nous allons déterminer l'effet de différents niveaux d'hormones sur la réplication et l'effet oncolytique de VSV. Ceci nous donnera ainsi la possibilité et les connaissances d'améliorer la sélection des patients pour le traitement et la conception d'une nouvelle génération de virus oncolytiques perfectionnés.

Mots-clés : cancer du sein, estrogène, virus oncolytique, VSV, estradiol, hormones, microenvironnement tumoral

Abstract and key words

Cancer is a disease that affects millions of people across the world. The most common cancer in Canadian women is breast cancer and it also represents the second cause of death by cancer in this same group. The treatment depends on multiple factors including the stage of the cancer, menopause status, hormone receptor status, HER2 receptor status, etc. The available treatments for breast cancer are surgery followed by either radiation or chemotherapy as well as endocrine therapy.

Despite numerous studies and advances in the treatment of different cancers, many patients' cancer still remains refractory to these treatments. An exciting new alternative treatment is the use of oncolytic viruses. An oncolytic virus is a virus that can specifically target cancer cells all while leaving healthy normal cells intact. However, many cancers remain refractory to treatment with oncolytic viruses. There was thus a need to investigate different factors or the tumor microenvironment that may predict viral susceptibility and obtain positive outcomes. In this vein, it was found that estrogen (specifically estradiol), a hormone found in the body, can render cancer cells that express its receptor more sensitive to oncolytic virus infection by VSV (vesicular stomatitis virus). In spite of that, we are unaware if there are other hormones capable of modulating the actions of oncolytic viruses. Our hypothesis is that, like estrogen, other hormones will affect the efficacy of oncolytic viruses and that it will be possible to manipulate these interactions with the goal to improve treatment response. Our research will allow the conception of enhanced therapeutic strategies for patients with breast cancer.

The importance of this study is that as of now the interplay between hormones and oncolytic viruses remains unexplored. We will determine the effects of hormone levels on viral replication and oncolytic ability of VSV. This knowledge will allow for a greater selection of patients for which oncolytic virus treatment will have a positive outcome. Additionally, it will allow for the development of a new generation of perfected oncolytic virus platforms.

Key words : breast cancer, estrogen, oncolytic virus, Vesicular stomatitis virus, VSV, estradiol, hormones, tumor microenvironment

Table des matières

RÉSUMÉ ET MOTS-CLÉS.....	I
ABSTRACT AND KEY WORDS.....	III
TABLE DES MATIÈRES.....	IV
LISTE DES TABLEAUX.....	VI
REMERCIEMENTS.....	XIV
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	1
• CHAPITRE 1 Le cancer et le cancer du sein.....	1
○ 1.1 Cancer – Introduction.....	1
○ 1.2 Le cancer du sein.....	2
• CHAPITRE 2 Les traitements standards du cancer du sein	4
○ 2.1 Traitements passés ou actuels : Chirurgie.....	4
○ 2.2 Traitements adjuvants : Chimio-, radiothérapie et thérapies ciblées.....	5
○ 2.3 La thérapie endocrine.....	8
○ 2.4 Les résistances aux traitements (de novo et acquises).....	11
• CHAPITRE 3 La virothérapie du cancer	15
○ 3.1 Les virus oncolytiques & virothérapie.....	16
○ 3.2 La rencontre des candidats : Notre modèle “Silver Bullet”.....	19
○ 3.3 Les OV dans le cancer du sein : À l’étude.....	23
○ 3.4 Les obstacles et les résistances de la virothérapie.....	25
• CHAPITRE 4 Facteurs importants dans le TME du cancer du sein :	
Estrogènes	28
○ 4.1 L’estrogène principal : Estradiol (E2).....	28
○ 4.2 Les estrogènes secondaires : Estrone (E1) et Estriol (E3).....	30
○ 4.3 Nouvelle hormone : Estetrol (E4).....	31
○ 4.4 Estrogènes vs TME & Système immunitaire.....	33

• CHAPITRE 5 Justification du projet et hypothèse.....	35
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	37
• 1. Lignées cellulaires et culture.....	37
• 2. Préparations des estrogènes et tamoxifène	37
• 3. Traitement avec les estrogènes	37
• 4. Traitement avec tamoxifène	38
• 5. Fluorescence et imagerie	38
• 6. Détermination du titre viral	38
• 7. Test de viabilité	38
• 8. Analyse statistique	39
RÉSULTATS.....	40
• 1. Effet de l'E2 sur VSVΔ51-YFP	40
• 2. Effet d'un gradient d'E2 sur la production virale et la cytotoxicité de VSVΔ51-YFP.....	43
• 3. Effet du blocage du ER sur la réplication virale de VSVΔ51-YFP.....	47
• 4. Effet des estrogènes secondaires (E1, E3, E4) sur la réplication virale de VSVΔ51-YFP.....	49
• 5. L'effet de estrogènes secondaire (E1, E3, E4) sur la production virale et la cytotoxicité de VSVΔ51-YFP.....	52
• 6. Comparaison entre tous les estrogènes sur la production virale et la cytotoxicité de VSVΔ51-YFP.....	55
DISCUSSION.....	59
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	66
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	XVII

Liste des tableaux

Chapitre 1 (Revue Bibliographique)

Tableau 1.2. Classification des différents sous-groupes de cancer du sein.....p. 3

Chapitre 2 (Revue Bibliographique)

Tableau 2.4. Les caractéristiques des différents sous-types de cancer du sein.....p. 14

Chapitre 3 (Revue Bibliographique)

Tableau 3.3 Les OVés utilisés dans les études précliniques et cliniques pour le cancer du sein.....p. 25

Chapitre 4 (Revue Bibliographique)

Tableau 4.3 Résumé des estrogènesp. 33

Liste des figures

Chapitre 1 (Revue Bibliographique)

Figure 1.1. Les étapes nécessaires à la carcinogènèse.....p. 2

Chapitre 2 (Revue Bibliographique)

Figure 2.1.1. Changement de la mastectomie radicale vers la mastectomie modifiée moins agressive.....p. 5

Figure 2.2.1. Les différents traitements adjuvants pour le cancer du sein....p. 6

Figure 2.2.2. Voie de signalisation PAM et fonctionnement d'évérolimus....p. 7

Figure 2.2.3. Rôle des cyclines et des CDK et mécanismes d'actions des médicaments inhibiteurs.....p. 8

Figure 2.3.1. Les différentes classes de thérapies endocrines.....p. 9

Figure 2.4.1. Mécanismes de résistance endocrine et cibles potentielles....p. 12

Chapitre 3 (Revue Bibliographique)

Figure 3.1.1. Exemple de thérapie génique à l'aide de vecteur viral.....p. 16

Figure 3.1.2. Effets de OV sur les cellules saines, les cellules cancéreuses et conséquences sur le TME.....p. 18

Figure 3.1.3. L'effet des OV sur le TME.....p. 19

Figure 3.2.1. Modèle de VSV et de son génome.....p. 21

Figure 3.4.1. Résumé des obstacles à l'utilisation de la virothérapie.....p. 27

Chapitre 4 (Revue Bibliographique)

Figure 4.1.1. Les voies de signalisation de l'estradiol.....p. 29

Figure 4.3.1. La synthèse de l'estetrol par le foie foetal.....p. 31

Figure 4.4.1. Effet de la concentration d'estrogène sur le système immunitaire et le TME.....p. 34

Résultats

Figure 1. L'E2 augmente la production virale de VSV Δ 51-YFP.....	p. 41
Figure 2. L'E2 augmente la production virale et la cytotoxicité de VSV Δ 51-YFP à plusieurs concentrations.....	p. 44
Figure 3. Effet du TAM sur la réplication virale de VSV Δ 51-YFP.....	p. 48
Figure 4. Effets de E1, E3 et E4 sur la réplication virale de VSV Δ 51-YFP.....	p. 50
Figure 5. L'effet de E1, E3 et E4 sur la production virale et la cytotoxicité de VSV Δ 51-YFP.....	p. 53
Figure 6. Effet comparatif entre tous les estrogènes sur la production virale et la cytotoxicité de VSV Δ 51-YFP.....	p. 56

Liste des sigles et abréviations

Abréviation	Anglais	Français
ABCE4	Advanced breast cancer estetrol study	Étude sur l'estetrol dans le cancer du sein avancé
ADN	Deoxyribonucleic acid	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Complementary DNA	ADN complémentaire
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme	Enzyme d'édition de l'ARNm de l'apolipoprotéine
AR	Androgen receptor	Recepteur d'androgène
ARN	Ribonucleic acid	Acide ribonucléique
ARNm	Messenger RNA	ARN messager
AI	Aromatase inhibitor	Inhibiteur d'aromatase
Akt	Protein kinase B (PKB)	Protéine kinase B (PKB)
BAX	BCL2-like protein 4	Protéine de type BLC2 4
Bik	BCL2 interacting killer	Tueuse en interaction BCL2
CAF	Cancer associated fibroblast	Fibroblaste associée au cancer
CAR	Chimeric antigen receptor	Récepteur antigénique chimérique
CETN2	Centrin-2	Centrin-2
CDK4/6	Cyclin dependent kinase 4/6	Cycline dépendante de kinase 4/6
CMV	Cytomegalovirus	Cytomégalovirus
COC	Combined oral contraceptive	Contraceptif oral combiné
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	Protéine associée aux lymphocytes T cytotoxiques 4
DAMP	Damage associated molecular pattern	Motif moléculaire associé au dommage
DC	Dendritic cell	Cellule dendritique
EGF	Epidermal-like growth factor	Facteur de croissance épidermique

ER	Estrogen receptor	Récepteur d'estrogène
ER α	Estrogen receptor alpha	Récepteur d'estrogène alpha
ER β	Estrogen receptor beta	Récepteur d'estrogène beta
ERCC1	Excision repair cross complementation group	Réparation de l'excision groupe de complémentacion croisée 1
ERK	Extracellular signal-regulated kinase	Kinase régulée par signal extracellulaire
ERR	Estrogen related receptor	Récepteur lié aux estrogènes
ERR α	Estrogen related receptor alpha	Récepteur lié aux estrogènes alpha
<i>ESR1</i>	Estrogen receptor 1	Récepteur d'estrogène 1
E1	Estrone	Estrone
E2	Estradiol	Estradiol
E3	Estriol	Estriol
E4	Estetrol	Estetrol
FBS	Fetal bovine serum	Sérum fœtal de boeuf
FDA	Food and Drug Administration	Administration américaine des aliments et des médicaments
FGF	Fibroblast growth factor	Facteur de croissance des fibroblastes
FKBP12	FK506 binding protein	Protéine de liaison FK506
G	Glycoprotein	Glycoprotéine
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony- stimulating factor	Facteur de stimulation des colonies granulocytes- macrophages
GPER	G protein-coupled estrogen receptor	Récepteur d'estrogène couplée à la protéine G
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2	Récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain
HDE4	High dose estetrol	Estetrol à haute dose

HMGB1	High mobility group box 1	Boîte de groupe à haute mobilité 1
HR	Hormone receptor	Récepteur d'hormone
HRT	Hormone replacement therapy	Hormonothérapie de la ménopause (substitutive)
HSV	Herpes simplex virus	Virus de l'herpès simplex
ICI	Checkpoint inhibitor	Inhibiteurs de points de contrôle
ICV	Infected cell vaccine	Vaccin à cellules infectées
IFN	Interferon	Interféron
IFN- β	Interferon-beta	Interféron-beta
IGF	Insulin-like growth factor	Facteur de croissance semblable à d'insuline
I κ B α	Inhibitor of NF- κ B alpha	Inhibiteur de NF- κ B alpha
IKK	Inhibitor of KappaB kinase	Inhibiteur de kinase kappaB
IT	Intratumoral	Intratumoral
Jak	Janus kinase	Kinase janus
L	Large polymerase	Grande polymérase
LAG-3	Lymphocyte activating gene 3	Gène d'activation lymphocytaire 3
M	Matrix protein	Protéine de matrice
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	Protéine kinase activée par le mitogène
MDSC	Myeloid-derived suppressor cell	Cellule suppressive dérivée de myéloïde
miARN	Micro-RNA	Micro-ARN
MOI/MI	Multiplicity of infection	Multiplicité d'infection
mTOR	Mechanistic target of rapamycin	Cible mécanistique de la rapamycine
N	Nucleoprotein	Nucléoprotéine
NEIL2	Nei like DNA glycosylase 2	Nei like ADN glycosylase 2
NEST	Native estrogen with selective tissue	Estrogène natif avec activité

	Activity	tissulaire sélectif
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	Facteur nucléaire activateur de la chaîne légère kappa des cellules B activées
NK	Natural killer	Cellule naturellement toxique
OV	Oncolytic virus	Virus oncolytique
P	Phosphoprotein	Phosphoprotéine
PAM	PI3K/Akt/mTOR pathway	Voie PI3K/Akt/mTOR
PAMP	Pathogen associated molecular pattern	Motif moléculaire associé au pathogène
PD-1	Programmed cell death protein 1	Protéine de mort cellulaire programmée 1
PD-L1	Programmed death-ligand 1	Ligand de mort programmé 1
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase	Kinase de phosphoinositide 3
PR	Progesterone receptor	Récepteur de progestérone
p53	Tumor protein p53	Protéine de tumeur p53
SERD	Selective estrogen receptor degrader	Dégradeur sélectif du récepteur d'estrogène
SERM	Selective estrogen receptor modulator	Modulateur sélectif du récepteur d'estrogène
shARN	Small hairpin RNA	Petit ARN en épingle de cheveux
siARN	Small interfering RNA	Petit ARN d'interférence
Src	Rous sarcoma oncogene	Oncogène du sarcome de Rous
STAT	Signal transducer and activator of transcription	Transducteur de signal et activateur de transcription
TAA	Tumor associated antigen	Antigène associé au tumeur
TAM	Tamoxifen	Tamoxifène
TAMs	Tumor associated macrophages	Macrophages associés à la tumeur
TLR	Toll like receptor	Récepteur de type toll

TME	Tumor microenvironment	Microenvironnement tumoral
TNBC	Triple negative breast cancer	Cancer du sein triple négatif
TNF	Tumor necrosis factor	Facteur de nécrose tumorale
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand	Ligand induisant l'apoptose lié au TNF
TSA	Tumor specific antigen	Antigène spécifique au tumeur
Treg	Regulatory T cell	Lymphocyte T régulateur
T-VEC	Talimogene Laherparepvec	Talimogene Laherparepvec
VSV	Vesicular stomatitis virus	Virus de la stomatite vésiculaire
VSV Δ 51	Vesicular stomatitis virus delta 51	Virus de la stomatite vésiculaire delta 51
WT	Wild-type	Type sauvage
YFP	Yellow fluorescent protein	Protéine de fluorescence jaune

Remerciements

Il est essentiel avant de terminer l'écriture de cette thèse de remercier Marie-Claude, ma directrice de recherche. Ce fut un honneur et un plaisir de faire partie de cette famille que tu as construite dans le laboratoire. Je me souviens toujours, dès notre première rencontre à l'entrevue, de l'importance que tu mets pour un esprit familial et ceci est évident par les actions de tous les membres de l'équipe que tu as soigneusement choisis. J'ai toujours eu beaucoup de plaisir lorsqu'on parlait de sciences ou de tous autres sujets à cause de ton enthousiasme, ton humeur, mais surtout des conseils et le confort ressenti après nos conversations. Je tiens à te remercier du fond de mon cœur pour le temps, l'énergie, le soutien et surtout l'aide que tu m'as donné au cours de mes deux années au laboratoire. Je sais que sans l'expérience et les opportunités qui m'ont été présentées, je n'aurais jamais eu la chance d'accomplir les prochaines étapes dans ma vie.

Je tiens également à remercier Victor, qui a eu la patience de me former, malgré mon expérience minime en laboratoire. C'était un immense plaisir et un aide énorme de t'avoir aux alentours pendant ces 2 années, qui m'ont permis d'évoluer sans crainte au long de mon court passage en recherche. J'apprécie toujours le fait que tu sois toujours le premier à offrir de l'aide peu importe la situation, mais surtout ton caractère unique et bienveillant. Tu es clairement une pièce essentielle au laboratoire qui permet aux autres de bien travailler tous ensemble.

À mes collègues de travail et amis, c'était un immense bonheur de travailler dans une équipe aussi motivée, dynamique mais surtout si proche. Grâce à vous j'avais l'impression de faire partie de la famille dès notre première rencontre à mon entrevue et ce sentiment ne s'est que renforcé avec tous les moments magnifiques passés ensemble. Nos potlucks, nos cafés à midi ainsi que nos petites pauses pour partager des potins vont me manquer beaucoup! Je tiens aussi à vous remercier aussi pour tout l'aide, la motivation et l'inspiration que vous m'avez donnée tout au long de mon séjour au sein de cette belle famille scientifique.

Merci à Dr. Nicholas Chomont pour son aide et ses conseils lors de mon comité de parrainage pour la maîtrise qui m'ont permis d'avancer mes projets de recherche. Merci également à tous les membres de mon jury de thèse qui ont accepté de corriger ma thèse : Dr. Guy Lemay et Dr. Gerardo Ferbeyre.

Finalement, je tiens à remercier infiniment mes parents et mon frère, qui ont suivi de très près mes aventures scientifiques et humaines. Merci de m'avoir supporté dans tous les sens tout au long de mes études et de m'aider du mieux de vos capacités à atteindre tous mes buts et objectifs. Merci d'avoir passé des heures à l'écouter lorsque je parlais de mes expériences ou mes données. Merci à vous de m'avoir montré et m'avoir rappelé à quel point vous étiez fiers et impressionnés par mes petits succès scientifiques. C'était toujours rassurant de vous avoir si près et je sais que ceci va continuer tout au long de mes prochaines aventures de vie.

Revue bibliographique

Chapitre 1 : Le cancer et le cancer du sein

1. Le cancer et le cancer du sein

1.1 Cancer – Introduction

Le cancer est la première cause de décès à travers le monde soit environ 10 millions de décès en 2020 avec les cancers les plus communs étant le cancer du sein, des poumons, du colon et de la prostate (1). En général, le cancer est une maladie où des cellules dans le corps se répliquent de façon incontrôlable et peuvent se propager à travers le corps (2). Cette évolution des cellules se fait de façon progressive et complexe où les cellules vont acquérir différentes caractéristiques qui vont leur permettre de devenir malignes.

Certaines de ces caractéristiques incluent une prolifération excessive, l'évasion de suppresseurs de tumeur, la résistance à la mort cellulaire, l'angiogenèse, une réplication immortelle, l'évasion active ainsi que la métastase (3). La tumorigénèse ou carcinogénèse, un terme qui décrit la transformation de cellules normales en cellules cancéreuses, est un processus complexe et dynamique qui est divisé en 4 étapes : l'initiation, la promotion, la progression et la métastase (4,5). L'initiation décrit un changement, une altération ou une mutation dans un gène de façon spontanée ou induite après une exposition à un agent cancérigène. Pour l'initiation du cancer, il est nécessaire que des gènes suppresseurs de tumeurs soient inactivés ou que des proto-oncogènes soient activés (5). La promotion s'agit d'une sélection clonale de cellules initiées qui risquent de devenir maligne. La progression décrit le phénomène où les cellules malignes acquièrent un phénotype et des caractéristiques plus agressives à travers le temps (6). La dernière étape est la possibilité de faire des métastases, c'est-à-dire que le cancer s'est propagé à un endroit différent du site primaire d'initiation. Les métastases représentent une des causes majeures de décès reliés au cancer. Pour ce faire, des cellules cancéreuses doivent se détacher, circuler dans le sang et survivre dans un nouvel environnement à un site secondaire (7). De façon générale, il est possible de classifier un cancer en 4 groupes différents selon son origine, soit les carcinomes, les sarcomes, les leucémies et les lymphomes (8). Les carcinomes se développent dans la peau ou les tissus qui couvrent les surfaces des organes ou des glandes et forment souvent des

cancers solides, c'est-à-dire dans les tissus épithéliales (8). D'autre part, les sarcomes sont des cancers qui affectent les tissus conjonctifs qui supportent et connectent le corps, par exemple les muscles, les tendons, les os, etc. (9).

Les leucémies quant à elles sont des cancers du sang et de la moelle osseuse où les cellules saines se transforment et vont croître de façon incontrôlable (10). Finalement, le dernier groupe est les lymphomes qui sont un cancer qui touche le système lymphatique, c'est-à-dire les lymphocytes qui sont des composantes essentielles de notre système immunitaire (11).

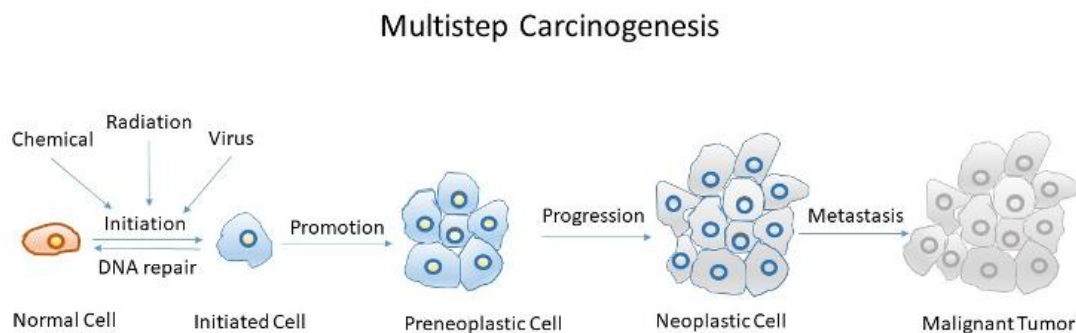


Figure 1.1. Les étapes nécessaires à la carcinogénèse.

Les 4 étapes de la carcinogénèse sont l'initiation, la promotion, la progression et la métastase qui permet la transformation de cellules saines en cellules cancéreuses. (Issu de Byerley et al., 2019)

Étant donné l'énorme impact du cancer à travers le monde, il y a plusieurs recherches en cours avec le but de découvrir des remèdes plus efficaces pour le traitement du cancer. Cependant, malgré les nombreuses études et les avancées dans les traitements pour les cancers, il n'existe toujours pas de traitement curatif.

1.2 Le cancer du sein

Comme le nom l'indique, le cancer du sein est un cancer qui se produit dans un ou dans les deux seins. Le sein peut être divisé en différentes composantes où un cancer peut commencer soit dans les lobules, les canaux, les mamelons, le gras ou le tissu conjonctif, ainsi que les vaisseaux sanguins ou lymphatiques (12). Le type le plus commun est un carcinome qui représente environ 80 % des cancers diagnostiqués (12).

Le cancer du sein est le cancer le plus commun chez les femmes canadiennes et la 2e cause de décès par cancer chez cette population. En 2022, le cancer du sein représente 25 % de tous les nouveaux cas de cancer et 14 % de tous les décès associés au cancer chez les femmes canadiennes (13). Le cancer du sein chez les hommes est possible, mais extrêmement rare. En effet, le cancer du sein masculin représente environ 1 % des cancers chez les hommes, ainsi qu'environ 1 % de tous les cancers du sein mondial (14). La classification du cancer du sein est en constante évolution. Traditionnellement, la classification des cancers du sein se base sur l'histologie et la biologie (15). Cependant, le cancer du sein est très hétérogène. C'est pour cette raison que plusieurs groupes ont effectué des études moléculaires sur l'expression génique. En regardant les niveaux d'expression du récepteur d'estrogène (ER), de progestérone (PR), HER2/neu, Ki-67 (marqueur de prolifération) et autres, les chercheurs ont été capable de diviser le cancer du sein en 5 sous-groupes. Les 5 sous-groupes sont « normal breast-like », luminal A, luminal B, HER2 enrichie et « basal-like » ou triple négatif (TNBC) (16). L'hétérogénéité du cancer du sein a un impact clinique très important sur l'incidence, la progression de la maladie, la survie et les traitements (17).

<u>Sous-types</u>	<u>ER</u>	<u>PR</u>	<u>HER2</u>	<u>Marqueur de prolifération (Ki-67)</u>
Luminal A	+	+/-	-	< 14%
Luminal B	+	+/-	+/-	≥ 14%
HER2+	-	-	+	≥ 14%
TNBC	-	-	-	≥ 14%

Tableau 1.2. Classification des différents sous-groupes de cancer du sein
 Les différents sous-groupes et leurs caractéristiques moléculaires de tous les cancers du sein selon l'expression de ER, PR, HER2 et Ki-67.

Chapitre 2 : Les traitements standards du cancer du sein

2. Les traitements standards

2.1 – Traitements passés ou actuelles : Chirurgie

Les traitements utilisés vont dépendre du type de cancer qui a été diagnostiqué. Très souvent une opération chirurgicale est utilisée pour enlever les tumeurs primaires. Par la suite, la radiothérapie et la chimiothérapie sont utilisées comme adjuvant aux traitements (14). Pendant le 20^e siècle, la chirurgie de Halsted a été considérée comme le standard d'intervention chirurgicale pour le cancer du sein. C'est une opération, aussi appelée mastectomie radicale, où les glandes mammaires, les deux muscles pectoraux et tout le tissu lymphatique axillaire jusqu'aux extrémités ont été excisés (18). L'étendue de la résection par la chirurgie a été associée avec une morbidité importante ainsi que plusieurs complications potentielles telles que la paresthésie, lymphœdème du bras, lésion du cartilage costal ou pneumothorax par perforation de l'espace intercostal (19). L'idée derrière cette technique très agressive était d'éviter les métastases qui pourraient survenir par la propagation locorégionale. En effet, comme plusieurs cancers, les métastases représentent environ 90 % des mortalités des patientes atteintes du cancer du sein (20). Cependant, plusieurs études ont démontré qu'il n'a pas d'avantage sur la récurrence du cancer ou la survie comparativement à des opérations moins agressives (21). Par la suite, des interventions moins agressives sont devenues le standard combiné avec des thérapies systémiques adjuvantes (22).

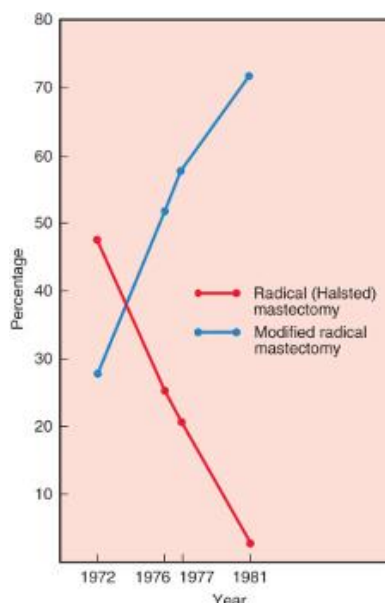


Figure 2.1.1 Changement de la mastectomie radicale vers la mastectomie modifiée moins agressive

Le changement dans les pratiques de chirurgie pour le traitement du cancer du sein à travers les années. Des études ont démontré que l'intervention plus radicale n'avait pas d'avantages significatifs comparé à l'opération moins invasive qui explique le changement dans les pratiques. (Issu de Bland et al., 2018)

2.2 – Traitements adjuvants : Chimio-, radiothérapie et thérapies ciblées

Un traitement adjuvant est un traitement systémique additionnel au traitement primaire contre un cancer qui a comme but de diminuer la dissémination pour éviter les métastases (23). Il existe plusieurs types différents de traitements adjuvants, dont la chimiothérapie, la radiothérapie, l'hormonothérapie (thérapie endocrine), des thérapies ciblées et la thérapie biologique (immunothérapie). Spécifiquement pour le cancer du sein, plusieurs études ont démontré que l'utilisation de radio-, chimio- et hormonothérapie adjuvante ou la thérapie ciblée HER2 réduit de façon significative la récurrence du cancer et augmente les taux de survie des patients (24,25). La chimiothérapie vise à éliminer les cellules cancéreuses à l'aide de médicaments en les ciblant directement ou en empêchant leur multiplication. Les traitements de chimiothérapies les plus communs sont une combinaison de cyclophosphamide avec de la doxorubicine ou docétaxel ou méthotrexate avec du 5-fluorouracil (26). La radiothérapie quant à elle est l'utilisation, comme le nom l'indique, de très fortes doses de radiation pour causer des dommages à l'ADN des cellules cancéreuses. La radiation est dirigée directement contre la tumeur ainsi que les ganglions lymphatiques régionaux après une résection de tumeur primaire (27). Cependant, l'utilisation de la chimio- et radiothérapie comme traitement systémique vient avec plusieurs effets secondaires à cause de sa toxicité hors cible qui limite l'utilisation. En effet, les toxicités vont affecter la qualité de vie des patients et même avec les traitements 40 % des patients vont avoir des récurrences et décéder de métastases du cancer (28). Un autre problème qui peut survenir lors de l'utilisation de ces traitements est le développement de résistance qui va rendre la thérapie inefficace (29).



Figure 2.2.1 Les différents traitements adjuvants pour le cancer du sein.

Les différents traitements adjuvants qui existent pour les patients atteints du cancer du sein sont la chimiothérapie, la radiothérapie, l'hormonothérapie, l'immunothérapie et les thérapies ciblées. (Adapté de verywellhealth)

Les thérapies ciblées sont utilisées directement contre des protéines spécifiques qui aident la croissance ou la survie des cellules cancéreuses. Plusieurs thérapies récentes pour les patients atteints de cancer du sein HER2+ (human epidermal growth factor receptor 2) utilisent des anticorps monoclonaux contre HER2, comme le trastuzumab (30). La protéine HER2 a un potentiel oncogénique important dans plusieurs cancers. En effet, des mutations dans cette protéine mènent souvent à une activation constitutive qui promeut la carcinogenèse et la croissance de cellules tumorales (31). Souvent, les anticorps monoclonaux contre HER2 sont donnés en combinaison avec la chimiothérapie adjuvante (30). Heureusement, il existe d'autres thérapies ciblées qui peuvent être utilisées pour le traitement du cancer du sein comme des inhibiteurs de la tyrosine kinase, des inhibiteurs de la voie mTOR et des inhibiteurs CDK4/6 (cyclines dépendantes de kinase 4/6) (32,33). Les tyrosines kinases sont des enzymes qui peuvent jouer un rôle important pour le développement des cellules cancéreuses (33). Environ 30-50 % des patients atteints de cancer du sein HER2+ avancé vont développer des métastases du système nerveux central. Les métastases de cerveaux représentent habituellement le premier site de récurrence du cancer chez ce groupe. L'administration d'anticorps monoclonal contre HER2 permet de ralentir les symptômes cérébraux, mais il a une faible pénétration qui limite l'efficacité (34,35). Les avantages des inhibiteurs tyrosines kinases, aussi connues sous le nom de médicaments à petites molécules, sont des propriétés physico-chimiques favorables qui leur permettent de pénétrer à travers la

barrière hématoencéphalique. Ceci permet de prévenir et même traiter les métastases du cerveau (35). Une autre option pour le traitement du cancer du sein par thérapie ciblée est la voie phosphoinositol 3 kinases (PI3K) /Akt/mTOR (PAM). Cette voie de signalisation fréquemment mutée est impliquée dans la prolifération cellulaire, la survie, le métabolisme ainsi que la motilité (36). Il est possible d'inhiber cette signalisation par l'inhibiteur mTOR everolimus (Afinitor) qui va lier son récepteur FKBP12, récepteur intracellulaire, et interférer avec les fonctions de mTOR en aval comme le démontre la figure 2.2.2. Ce médicament est utilisé chez les patients atteints de cancer du sein HR+ (récepteur hormonal) /HER2- métastatique (37).

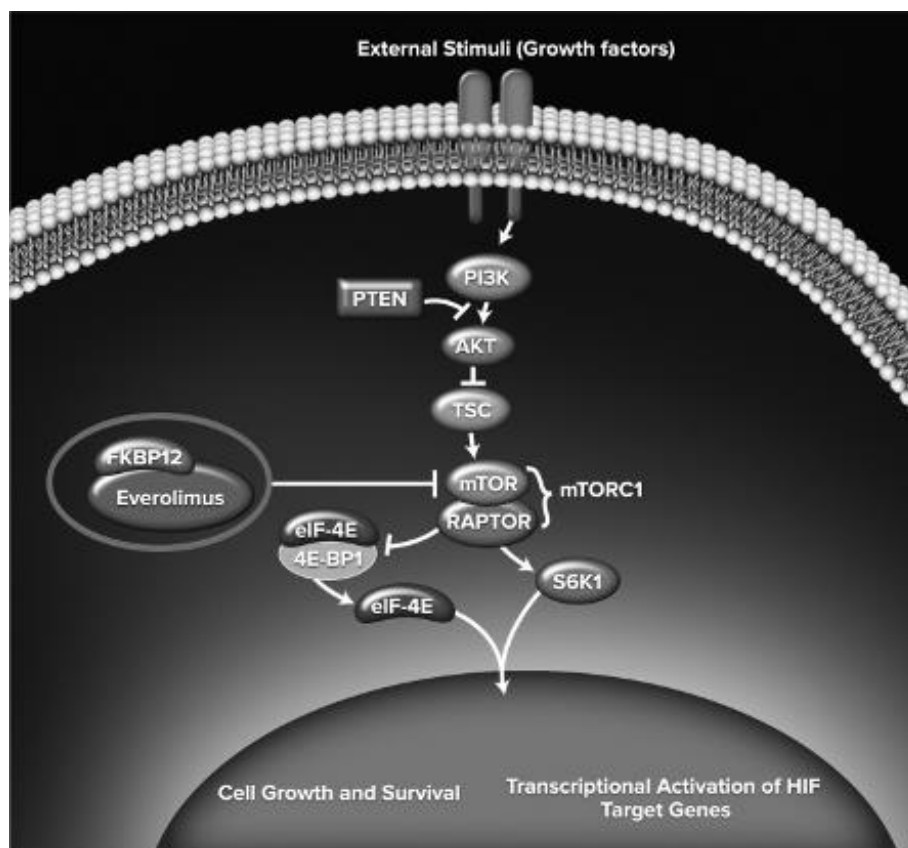


Figure 2.2.2 Voie de signalisation PAM et fonctionnement d'évérolimus

La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR induit la prolifération cellulaire, la survie et la transcription de gènes importants dans les cellules cancéreuses. L'évérolimus va lier son récepteur intracellulaire (FKBP12) qui a comme conséquence l'inhibition de la voie mTOR. (Issu de Royce et Osman, 2015)

Finalement, la dernière classe de thérapie ciblée est les inhibiteurs CDK. Les cyclines et les CDK sont cruciales pour réguler la progression des différentes phases du cycle cellulaire (33,38). Ceux-ci sont souvent dérégulés dans les cellules cancéreuses et sont donc une cible intéressante pour le traitement du cancer. Les 3 agents approuvés,

soit palbociclib, ribociclib et abemaciclib agissent de façon similaire comme il est possible d'observer dans la figure 2.2.3, mais ont certaines propriétés différentes qui permettent des applications cliniques uniques selon les situations (38). Ce type de traitement est surtout utilisé pour les cancers du sein HR+ métastatiques en combinaison avec l'hormonothérapie (39).

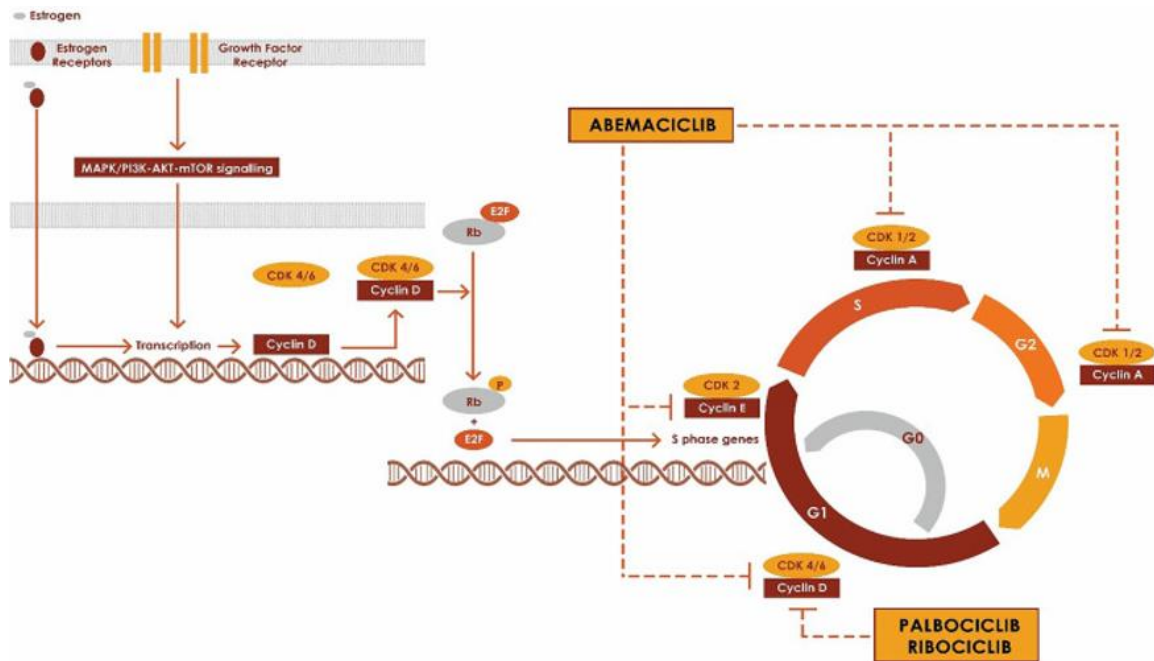


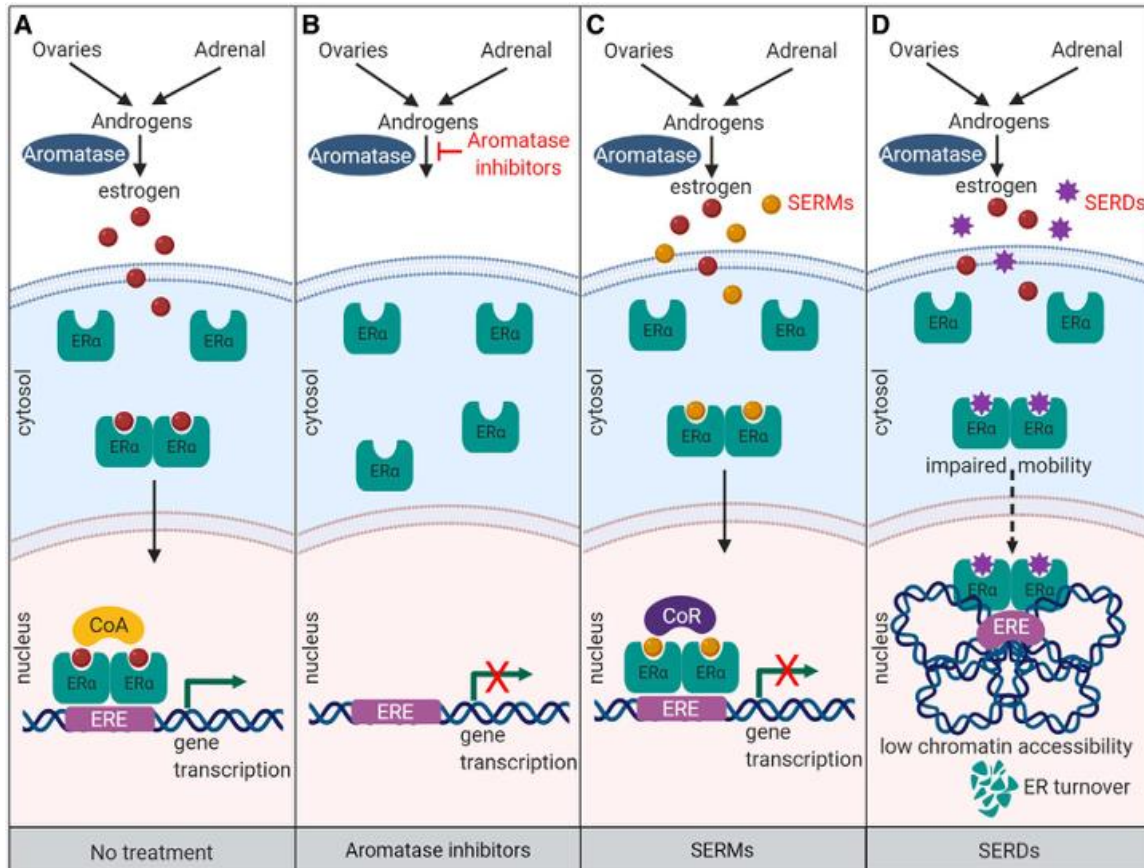
Figure 2.2.3 Rôle des cyclines et des CDK et mécanisme d’actions des médicaments inhibiteurs

La figure montre le cycle cellulaire et l’implication des différentes cyclines et CDKs. De plus, le mécanisme d’action des médicaments palbociclib, ribociclib et abemaciclib sur le cycle cellulaire est montré. (Issu de George et al., 2021)

2.3 – La thérapie endocrine

Presque 75 % des cancers du sein diagnostiqués expriment le récepteur de l’estrogène alpha ($ER\alpha$) (40). Une tumeur est considérée comme HR+ lorsqu’au minimum 1 % des cellules testées ont un ER et/ou PR, sinon elles sont HR - (41). Dans ce contexte, il est possible d’utiliser l’hormonothérapie pour cibler directement l’ER ou supprimer la production d’estrogène de type estradiol (E2). L’estrogène est connu depuis longtemps comme étant un facteur important dans les carcinomes hormonodépendants comme l’ovaire, le sein, le colon et même la prostate (42). L’effet oncogénique d’E2 est par la liaison à son récepteur sur les cellules tumorales qui permet l’augmentation de la transcription de facteurs de croissance et de survie tels que facteurs de croissance

semblable à l'insuline (IGF), facteurs de croissance des fibroblastes (FGF) et facteurs de croissance épidermique (EGF) (43-47). Étant donné l'importance d'E2 et d'ER dans le cancer du sein HR+, des traitements ciblant ces derniers sont utilisés depuis des décennies. Les thérapies endocrines incluent des modulateurs ou dégradeurs sélectifs du récepteur de l'estrogène (SERM ou SERD), des inhibiteurs d'aromatase (AI) ainsi que la suppression ovarienne (48).



Figures 2.3.1 Les différentes classes de thérapies endocrines

La figure montre le rôle et la signalisation des estrogènes dans les cellules tumorales ainsi que les types de thérapies endocrines tels que SERM, SERD et AI. (Figure adaptée de Hanker et al., 2020)

Les SERMs sont des agents synthétiques non stéroïdiens avec des activités estrogéniques agonistes et antagonistes variables selon le type de tissu ciblé (49). Le mécanisme d'action des SERMs repose sur l'interaction tissu spécifique avec les 2 sous-unités de l'ER (ERα ou ERβ). Par exemple, ils agissent comme des agonistes de l'ER pour maintenir la densité des os (ostéoporose) en diminuant l'activité des ostéoclastes et la résorption osseuse. D'autre part, ils interviennent comme antagonistes dans les tissus du sein qui permettent leurs applications en tant que traitement de cancer du sein (50).

Un des plus connus est le tamoxifène, médicament de première génération, qui est un antiestrogène approuvé pour le traitement et la prévention du cancer du sein chez les patientes en ménopause. Ensuite, le torémifène, aussi de première génération, est comparable au tamoxifène, mais semble moins toxique sur le foie des patients (51). Finalement, le raloxifène, médicament de deuxième génération, quant à lui est approuvé pour la prévention et le traitement de l'ostéoporose ainsi que la prévention du cancer du sein (52).

Pour ce qui est des SERDs, ils sont similaires aux SERMs puisqu'ils vont cibler l'ER, mais ont un mécanisme d'action différent. En effet, la liaison du SERD à l'ER va permettre la formation d'un complexe instable qui induit sa dégradation par le protéasome (53). Le fulvestrant est le seul SERD qui est approuvé pour le traitement du cancer du sein, mais il y a beaucoup d'études qui sont en cours pour la conception d'une nouvelle génération de SERDs (54). Notamment, un premier SERD oral, l'elacestrant, est en processus d'être approuvé par la FDA à cause de résultats prometteurs dans l'étude clinique EMERALD (552). Brièvement, l'objectif de l'étude était de comparer l'efficacité et la sécurité de l'elacestrant en monothérapie par rapport aux traitements standard après traitement avec un inhibiteur de CDK4/6 chez des patients avec un cancer du sein avancé ER+/HER2-. L'elacestrant a démontré une amélioration significative de la survie sans progression de la maladie dans la population générale et les patients avec mutations *ESR1*, le gène qui encode l'ER α (55).

Cependant, au lieu de cibler directement l'ER, il existe une façon plus directe pour interférer avec la progression du cancer dépendant à l'estrogène qui est de simplement diminuer les niveaux produits. Une des façons d'accomplir cet objectif se fait par la suppression ovarienne qui peut se faire de 2 moyens différents. Une méthode temporaire est par l'utilisation d'antagonistes de l'hormone de libération des gonadotrophines (56). L'hormone de libération des gonadotrophines stimule la sécrétion de l'hormone lutéinisante et de l'hormone de stimulation de follicules par la glande pituitaire. La conséquence est le contrôle des hormones et des fonctions reproductives des gonades d'où l'importance de son inhibition dans des maladies hormonodépendantes comme le cancer du sein (57). La deuxième option qui vient avec des changements importants permanents s'appelle l'ablation ovarienne. C'est une opération qui enlève un ou deux ovaires (ovariectomie). La conséquence est la diminution des niveaux d'estrogènes

circulant dans le corps qui a un effet relativement positif sur la survie sans maladie et la survie générale (58,59). L'autre méthode par laquelle il est possible de faire diminuer les niveaux d'estrogènes est par les Als. Les Als inhibent la capacité du corps de produire de l'estrogène à partir de la testostérone en inhibant l'activité de l'enzyme aromatasase (60). En effet, la synthèse de l'estrogène nécessite la présence de cellules thécales et de cellules de la granulose. Les cellules thécales ne peuvent pas produire directement de l'estrogène, mais elles produisent de l'androgène. Ensuite, l'androgène est transporté dans les cellules de la granulose où il sera métabolisé par l'enzyme aromatasase en estrogène. Les Als de troisième génération, soit le létrozole, l'anastrozole et l'exemestane commencent même à prendre la place du tamoxifène comme traitement de première ligne pour le traitement du cancer du sein HR+. Les cancers du sein montrent une activité de l'aromatasase plus importante et l'enzyme pourrait être liée directement ou indirectement par les Als stéroïdal (exemestane) ou non-stéroïdal (anastrozole ou létrozole) respectivement (60,61). Bref, il est possible de constater que pour les cancers du sein HR+ et/ou HER2+ il existe une panoplie d'armes pouvant être utilisées pour combattre le cancer. Cependant, ces traitements ne sont pas une possibilité pour tous les sous-types de cancer du sein et ne sont pas nécessairement une option tout au long de la durée de traitement.

2.4 – Les résistances aux traitements (de novo et acquises)

Les cancers du sein ER+ sont souvent considérés comme le sous-type le plus traitable et avec les meilleurs pronostics. Par contre, même si initialement le cancer répond à la thérapie endocrine, 15-20 % des tumeurs sont naturellement résistantes à la thérapie et 30-40 % vont acquérir une résistance après plusieurs années de traitements (62). La résistance à la thérapie hormonale mène à la récurrence de la maladie et des métastases qui ultimement vont causer la mort chez la grande majorité des patients. Il existe plusieurs mécanismes qui permettent la résistance aux traitements.

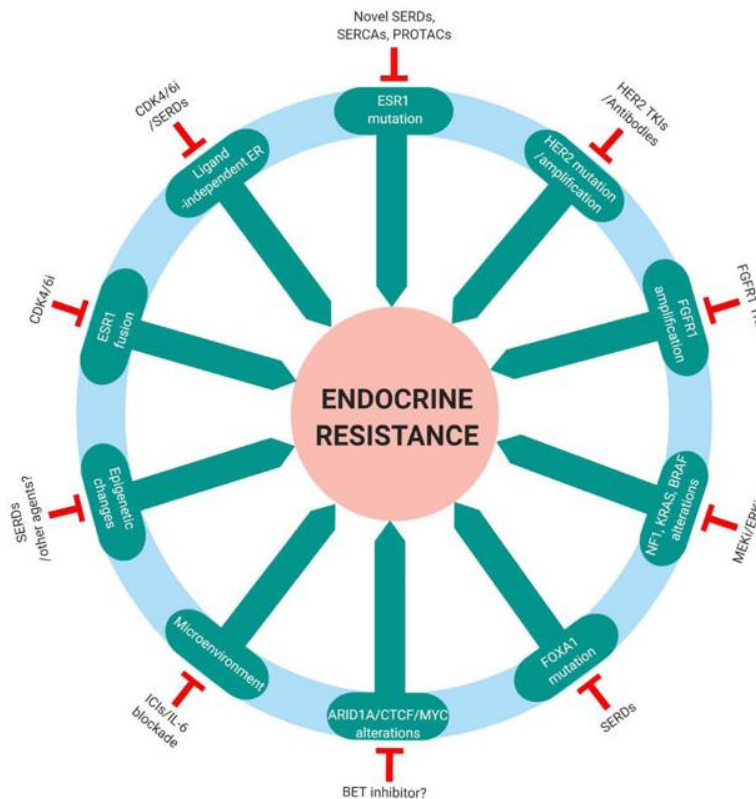


Figure 2.4.1 Mécanismes de résistance endocrine et cibles potentielles

Cette figure montre différents mécanismes par lesquels un cancer peut devenir résistant à la thérapie endocrine. Des thérapies pour cibler les différentes causes sont suggérées pour combattre la résistance. (Issu de Hanker et al., 2020)

Par exemple, certaines données indiquent que l'acquisition d'altérations faux-sens sur ESR1 est un mécanisme commun de résistance qui représente environ 20-30 % des cancers du sein ER+ récurrents (63). De plus, ces mutations sont souvent présentes de façon concomitantes la formation de protéines de fusions ESR1, des protéines souvent hyperactives qui sont ligands indépendants. Ces protéines vont causer l'activation de la transition épithéliale mésenchymale qui provoque la prolifération de cellules hormono-résistantes et les métastases (62,63). Des défauts dans les voies de réparations de l'ADN ont aussi été signalés comme étant des initiateurs de la résistance aux médicaments. Selon des études indépendantes sur des patients, il existe des corrélations entre la perte d'expression de CETN2 (centrin-2) et ERCC1 (réparation de l'excision groupe de complémentation croisée 1) dans la voie de réparation par excision de nucléotides et NEIL2 (Nei-like ADN glycosylase 2) de la voie de réparation par excision de base (64). Plusieurs études semblent montrer l'importance de voies de signalisation oncogénique qui sont à la base de la résistance endocrine. Ces voies inclus les tyrosines kinases de facteurs de croissance (HER2, IGF, FGF, EGF), la voie PAM, MAPK/ERK (protéine kinase

activée par le mitogène/kinase régulée par signal extracellulaire), Src (oncogène du sarcome de Rous), CDK4/6 (65). Outre les altérations somatiques, d'autres mécanismes de résistances sont décrits dans la littérature comme des changements épigénétiques et non génétiques (ex. cellules souches cancéreuses), la reprogrammation métabolique et des changements dans le microenvironnement tumoral (ex. hypoxie, facteurs stromales, etc. - TME) (66). Certaines études cliniques récentes montrent qu'une combinaison de thérapie endocrine avec des inhibiteurs pharmacologiques serait une stratégie intéressante pour surmonter les résistances (67). Par exemple, les inhibiteurs CDK4/6 sont une des thérapies ciblées efficaces lors de situation de résistance endocrine. Cependant, son utilisation clinique vient avec certaines difficultés, notamment le coût du traitement, les effets secondaires (ex. neutropénie, fatigue, nausée, etc.) et le plus important étant que certaines tumeurs réfractaires à la thérapie endocrine ne répondent pas à l'inhibition CDK4/6 (62).

D'autre part, le cancer TNBC est "naturellement" résistant aux thérapies ciblées et l'hormonothérapie dû au manque de ces cibles moléculaires (68). Le TNBC ou "basal-like" est considéré comme le sous-type le plus agressif avec les plus grands taux de récurrence et une forte incidence de métastase du cerveau (68,69). Normalement, les anthracyclines et les taxanes (chimiothérapie) sont donnés comme traitement de TNBC, mais avec succès limités (69). En effet, 58% des patients avec un cancer TNBC comparativement à seulement 21% pour un cancer luminal A avaient une maladie résiduelle minimale malgré la chimiosensitivité initiale. Ceci explique les grandes chances de récurrences et les mauvais pronostics associés aux cancers TNBC (69). Initialement avec la chimiothérapie, il est possible d'observer des réponses favorables, mais rapidement les patients développent des résistances aux médicaments. La récurrence de maladie est très commune et la survie médiane n'est que de 13 mois (70). Beaucoup d'options thérapeutiques ont été créées par l'avancement de notre compréhension des cancers qui augmentent significativement la survie des patients. Tout de même, la nécessité d'une meilleure option de traitements pour améliorer la qualité de vie et la survie des patients est encore très présente.



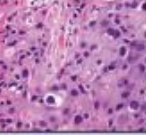
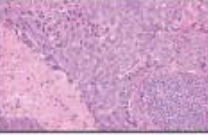
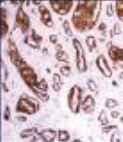

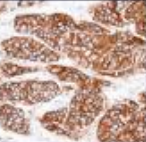

Molecular subtype	Luminal (A and B)		HER2	Basal
Genetic profile	↑Luminal CKs and ER-related genes (A>B) B↑ in proliferation-related genes		↑HER2-related genes	↑Basal CKs
Histologic correlates				
	A Lower-grade ER+	B Higher-grade ER+	High-grade, ± apocrine features	High-grade, sheet-like, necrosis inflammation
Surrogate markers				
	A Strong ER+, PR±, HER2-, low Ki67	B Weaker ER+, PR±, HER2±, ↑Ki67	HER2+, ± ER/PR	ER/PR- HER2- CK5/6± EGFR±
Prognosis	Good	Intermediate	Worse	Worse
Response to chemotherapy	Lower	Intermediate	Higher	Higher
Targeted therapies	Hormone therapies		HER2-targeted therapies	Currently investigational

Tableau 2.4. Les caractéristiques des différents sous-types de cancer du sein

La figure montre les caractéristiques des sous-types de cancer du sein (Luminal A & B, HER2+ et TNBC) comme le profilage génétique, un exemple histologique, les différents marqueurs, le pronostic et les thérapies standards (*Issu de Allison et al., 2016*)

Chapitre 3 : L'alternative naissante - Virothérapie

3. La Virothérapie du cancer

3.1 - Les virus oncolytiques & virothérapie

Le processus de carcinogenèse, comme décrit précédemment, mène à l'accumulation de mutations dans les cellules cancéreuses qui leur permettent de résister à la mort cellulaire, avoir une réplication immortelle et de s'échapper de la surveillance immunitaire (3). Incidemment, les mutations qui donnent ces caractéristiques essentielles pour les cellules cancéreuses les rendent d'hôtes idéaux pour la virothérapie par l'accumulation de mutations dans des voies de signalisation importante pour la défense antivirale des cellules. La virothérapie est une stratégie où des virus dits oncolytiques exploitent des défauts causés par les mutations liées à la carcinogénèse pour cibler spécifiquement les tumeurs et les lyser (71). Puisque les cellules cancéreuses sont des hôtes idéaux pour les virus oncolytiques (OV), les virus vont pouvoir se répliquer à l'intérieur des tumeurs. Ceci permet de cibler directement la tumeur par l'oncolyse, stimuler le système immunitaire et potentiellement délivrer des produits/gènes d'intérêt aux cellules cibles selon la stratégie utilisée. Il est possible de diviser la virothérapie en 2 sous-groupes différents : (I) comme vecteurs pour la thérapie génique du cancer et (II) comme immunothérapie virale à l'aide de OV (72-74).

I. Thérapie génique du cancer avec virus oncolytique

Le but de la thérapie génique est d'introduire/livrer un gène dans les cellules cibles cancéreuses qui va les tuer directement ou indirectement. Les thérapies géniques antérieures ont été conçues pour exprimer des copies "wild-type" (WT) de gènes suppresseurs de tumeurs permettant une cytotoxicité sélective (75). Une telle méthode est une combinaison d'un OV avec un transgène WT de p53 sous contrôle d'un promoteur de CMV, un gène suppresseur de tumeur impliqué dans la tumorigénèse (76). Cependant, une stratégie plus directe est celle de la thérapie génique du suicide. Cette technique implique la livraison par OV d'un gène toxique ou un gène qui permet la conversion d'une prodrogue inactive en drogue cytotoxique spécifiquement dans les cellules cancéreuses induisant leur mort cellulaire (77). Deux des stratégies de thérapie génique du suicide sont (i) le virus de l'herpès simplex (HSV) — gène de la thymidine kinase en combinaison avec la prodrogue ganciclovir et (ii) le gène de la cytosine désaminase en combinaison avec la prodrogue 5-fluorocytosine (78-80). Une autre stratégie très commune avec l'utilisation de gène cytotoxique est TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Par exemple, une

étude par Zheng et al. a montré qu'un adénovirus codant un TRAIL soluble a été efficace pour inhiber la croissance de tumeur de cancer du sein (81). Il existe de nombreux autres gènes pro-apoptotiques qui ont été étudiés comme thérapie génique dont Bik, BAX et ligand FAS (82-84). De façon intéressante, les thérapies géniques avec chimiothérapies montrent souvent des résultats antitumoraux additifs ou synergiques, lorsqu'on les utilise en combinaison (81).

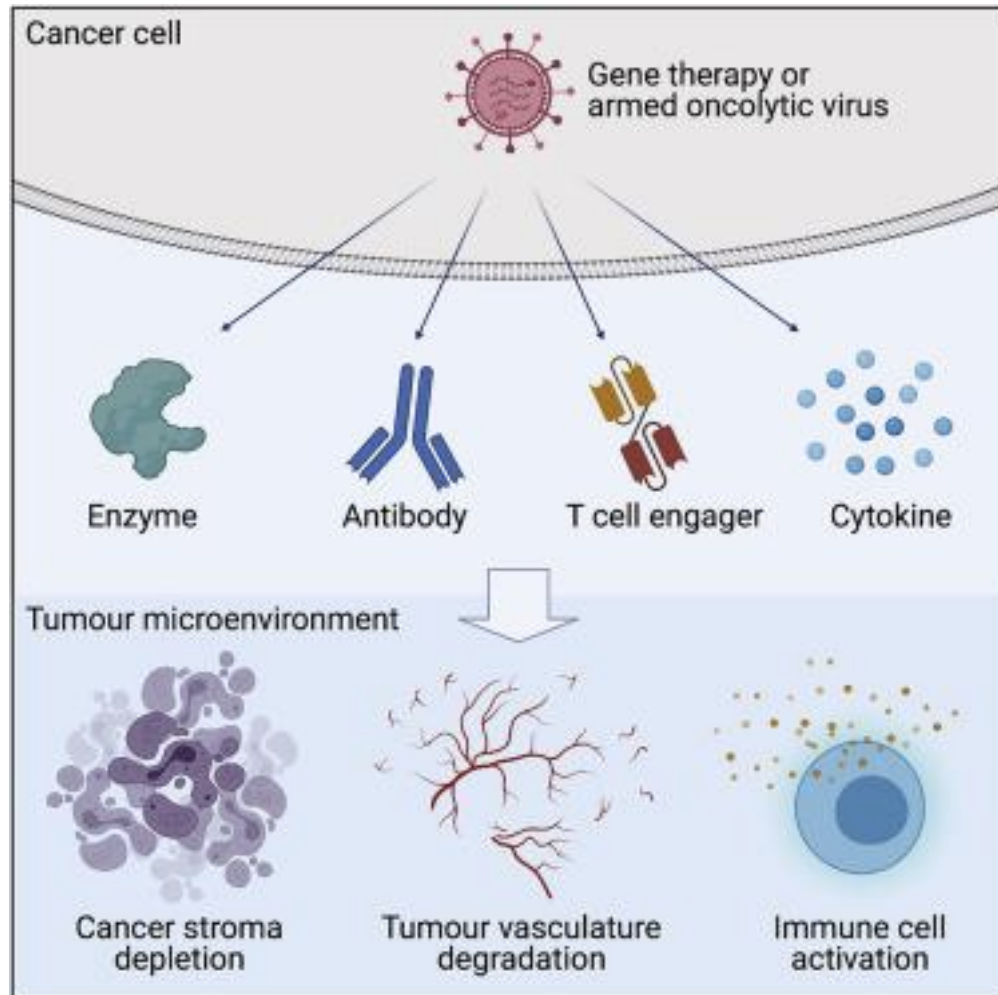


Figure 3.1.1 Exemple de thérapie génique à l'aide de vecteur viral

La figure montre l'utilisation de vecteur viral pour la thérapie génique par exemple à l'aide de gène suicide ou de gène stimulant le système immunitaire pour le traitement d'un gliome. (Adapté de Wan et al., 2021)

II. Immunothérapie virale : Ami ou ennemi

Il y a de nombreuses années, le système immunitaire était considéré comme un des plus grands obstacles dans l'utilisation des OV. Cette idée a été fondée sur la croyance que le seul mécanisme par lequel les OV exercent leurs fonctions

antitumorales était la lyse directe des cellules tumorales par la réplication virale (85,86). Les chercheurs croyaient que la réponse antivirale du système immunitaire était si néfaste pour l'efficacité antitumorale des OV's qu'ils utilisaient des drogues immunosuppressives. Un exemple de ceci est la combinaison de OV's et la cyclophosphamide pour augmenter l'oncolyse (87,88). De nos jours, il y a eu un changement dans cette mentalité par le nombre de résultats montrant qu'un élément essentiel du succès des OV's est de stimuler le système immunitaire pour générer une réponse immunitaire antitumorale, le concept à la base des immunothérapies du cancer. Une étude de Prestwich et al. (89) a montré qu'un système immunitaire fonctionnel est un prérequis pour le succès de la virothérapie. Il existe même des stratégies vaccinales anti-cancéreuses à l'aide de OV's à cause de leur capacité de stimuler le système immunitaire. Une de ces stratégies est la vaccination hétérologue « prime-boost ». Comme le nom l'indique, deux vecteurs viraux différents encodent le même antigène cancéreux d'intérêt qui permet le développement d'une réponse immunitaire importante envers l'antigène et donc, dirigée contre le cancer (90).

Les mécanismes des OV's qui permettent de stimuler le système immunitaire contre une tumeur sont multiples. Naturellement, un des facteurs évidents est l'oncolyse par le virus qui permet le relâchement de DAMPs (dommages aux motifs moléculaires associés), de PAMPs (motifs moléculaires associés aux agents pathogènes) ainsi que des TSA/TAA (antigènes spécifiques aux tumeurs/antigènes associés aux tumeurs) (91,92). Ces composants vont être cruciaux pour l'initiation d'une réponse spécifique à la tumeur par le système immunitaire adaptatif à l'aide des cellules dendritiques (DC), les cellules présentatrices d'antigènes (93). Deuxièmement, plusieurs OV's peuvent induire la mort immunogénique des cellules cancéreuses (94). Comme le nom l'indique, la mort immunogénique des cellules est immunogène, à l'opposé de la mort cellulaire physiologique comme l'apoptose qui est tolérogénique. Ceci va jouer un rôle primordial dans la stimulation d'une réponse antitumorale au lieu d'une réponse anti-inflammatoire après le traitement qui est essentiel pour le succès thérapeutique (95). La mort immunogénique est caractérisé par une expression à la surface cellulaire de calréticulin et/ou protéines de choc thermique qui va affecter la reconnaissance d'antigène ou la maturation de DCs. D'autre part, de façon plus tardive il va avoir un relâchement de HMGB1 (high mobility group box 1) qui va stimuler le "toll-like receptor 4" essentiel pour la présentation optimale d'antigènes tumoraux (96). Un autre aspect important de la spécificité des OV's pour les cellules cancéreuses est que la réponse immunitaire

antivirale va cibler les cellules cancéreuses infectées en même temps (97). Souvent, les cellules cancéreuses infectées par des OV vont exprimer des antigènes virus-spécifiques à leur surface qui permettent aux cellules T CD4+ et CD8+ de les cibler (97). Finalement, une des fonctionnalités critiques des OV pour la stimulation du système immunitaire contre la tumeur est sa capacité de modifier le TME.

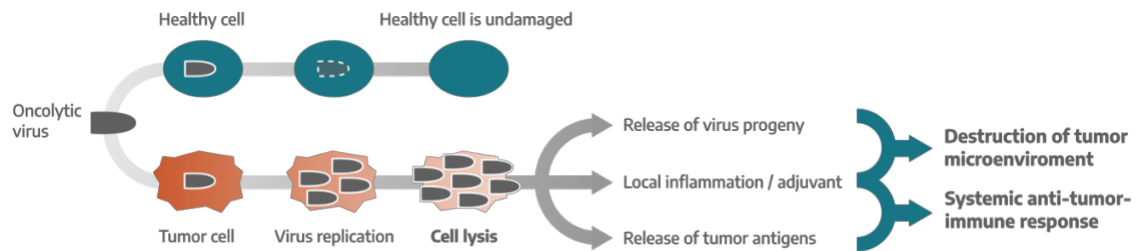


Figure 3.1.2 Effets de OV sur les cellules saines, les cellules cancéreuses et conséquence sur le TME

Les OV peuvent infecter les cellules saines, mais les défenses antivirales vont permettre de défendre la cellule et la laisser intacte. À l’opposé, les cellules cancéreuses qui ont souvent des défauts dans les voies antivirales vont permettre la réplication, la lyse des cellules et la stimulation d’une réponse immunitaire antitumorale. (*Adapté de ViraTherapeutics*)

Le TME est composé non seulement de cellules tumorales, mais de cellules immunitaires (cellules T, cellules B, DCs, macrophage, neutrophiles, etc.), cellules stromales (ex. péricytes, fibroblastes) et des molécules extracellulaires qui jouent des rôles importants dans la croissance tumorale (98,99). Souvent, le TME peut être décrit comme étant « froid » ou « chaud ». Un TME est considéré comme étant « froid » ou immunosuppresseur lorsqu’il y a peu de cellules immunitaires infiltrantes ainsi qu’une faible possibilité de stimuler une réponse immunitaire ou ne répondant pas à l’immunothérapie comme les inhibiteurs de points de contrôle (ICI) (100). Les ICIs sont une forme d’immunothérapie avec anticorps monoclonaux qui ciblent les récepteurs inhibiteurs (ex. CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3) et les ligands (PD-L1) sur les cellules T, les cellules présentatrices d’antigènes et les cellules tumorales. Ceci empêche les protéines des cellules cancéreuses d’inhiber la réponse immunitaire ou “peser le bouton d’arrêt”. Le but est de revigorer le système immunitaire pour générer une réponse immunitaire antitumorale (101). Évidemment, dans le contexte d’un TME « froid » les ICIs ne seront pas efficaces. Pour ce faire, il est nécessaire d’avoir un TME « chaud » marqué par l’accumulation de cytokines inflammatoires et des cellules T infiltrant la tumeur qui vont répondre aux ICIs (102). Finalement, il a été démontré que les réponses immunitaires antivirales dans le TME contre les OV peuvent convertir un TME immunologiquement

« froid » vers un TME « chaud » (100,103). Ceci rend potentiellement les OV comme un partenaire essentiel à l'utilisation de ICI et autres formes d'immunothérapies du cancer dans le futur (103). Évidemment, la caractéristique la plus importante de l'utilisation des OV est le relâchement d'antigène tumoraux dans un contexte proinflammatoire stimulant pour le système immunitaire. Bref, les OV sont une forme d'immunothérapie de cancer, car la fonctionnalité du système immunitaire est nécessaire pour l'exploitation de la réponse antitumorale stimulée.

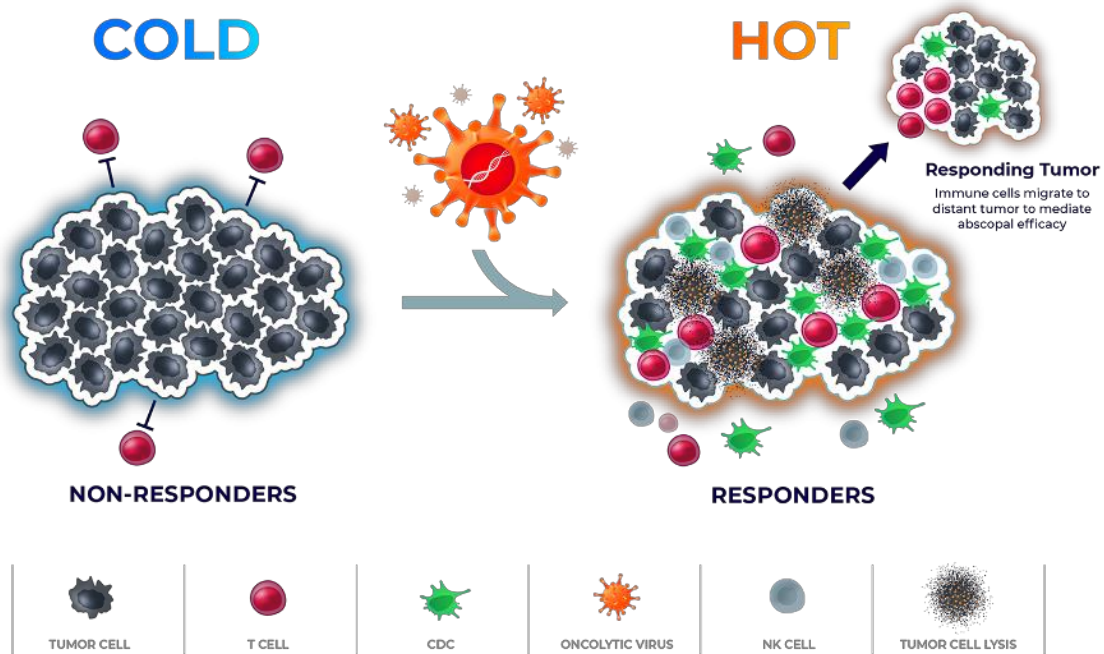


Figure 3.1.3 L'effet des OV sur le TME

Les OV ont la capacité de transformer un TME "froid" vers un TME "chaud" capable de stimuler une réponse immunitaire antitumorale. (Adapté de Oncorus, 2020)

3.2 - La rencontre des candidats : Notre modèle "Silver Bullet"

Le seul virus OV approuvé par la FDA en 2015 pour le traitement de mélanome métastatique en Amérique du Nord est Talimogene Laherprevac (T-VEC), un virus herpès simplex (HSV) qui encode GM-CSF (104). Plusieurs études cliniques évaluent différents virus soit génétiquement modifiés ou naturellement oncolytiques. Notamment les adénovirus, le HSV, le virus de la rougeole, les rétrovirus, le Newcastle disease virus, les réovirus, vaccinia ainsi que le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) sont parmi les plus étudiés qui montrent des résultats prometteurs (105,106).

Il existe plusieurs facteurs à considérer pour choisir l'OV optimal. Par exemple, des facteurs importants pour la sélection d'un virus oncolytique sont la taille du génome ainsi que des particules virales (petit vs grand), le tropisme tumoral, le potentiel pathogénique, l'immunogénicité, la possibilité de combinaison avec d'autres traitements et la stabilité virale (107). D'autres part, il faut décider entre un OV à base d'ARN ou d'ADN qui ont chacun des avantages et des inconvénients spécifiques à eux. De façon générale, les OVs à base d'ARN (ex. virus de la rougeole, VSV) sont capables de tuer les tumeurs plus rapidement que les OVs à base d'ADN puisqu'ils se répliquent dans le cytoplasme (108). À l'opposé des OV à base d'ADN, les OVs à base d'ARN n'ont pas besoin de se rendre au noyau pour leur réplication. Cependant, pour cette même raison, les virus à base d'ARN ont moins de propriétés sélectives pour la tumeur. Un autre facteur important à prendre en considération est la présence ou non d'enveloppe puisque les virus enveloppés ont plus de chance de se faire reconnaître et éliminer par le système immunitaire (108).

Cette thèse va se concentrer surtout sur notre virus modèle VSV, un OV d'étude clinique, en raison de nombreuses caractéristiques de ce virus. Notamment, certains OVs ne sont pas optimisés pour les études précliniques comme le virus de la rougeole (infecte que des cellules humaines) ou vaccinia et HSV (plus efficace chez humain comparé aux souris) contrairement à VSV qui peut infecter et tuer les cellules tumorales humaines et/ou murines (109-112). Il y a même certains OVs qui ont été brevetés dont le virus Maraba et Newcastle disease virus qui rend leur obtention, utilisation et publication des résultats plus complexe.

VSV, membre de la famille des rhabdovirus, est un virus ARN simple brin de polarité négative avec un génome de 11 kilobases (kb) en forme de balle (bullet-shaped) (113). Le génome est divisé en 5 parties subgénomiques qui encodent les 5 protéines distinctes du virus soit la nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P), la protéine de matrice (M), la glycoprotéine (G) et la grande polymérase (L). Les protéines N, P, L ainsi que des protéines spécifiques de l'hôte sont responsables de la transcription et la réplication virale (113,114). Le complexe de la polymérase ARN dépendante d'ARN (les protéines N, P et L) transcrit l'ARN par un mécanisme début-arrêt (start-stop—stutter) qui fait en sorte qu'il y a une gradation dans la production des protéines (ex. $N > P > M > G > L$) (114).

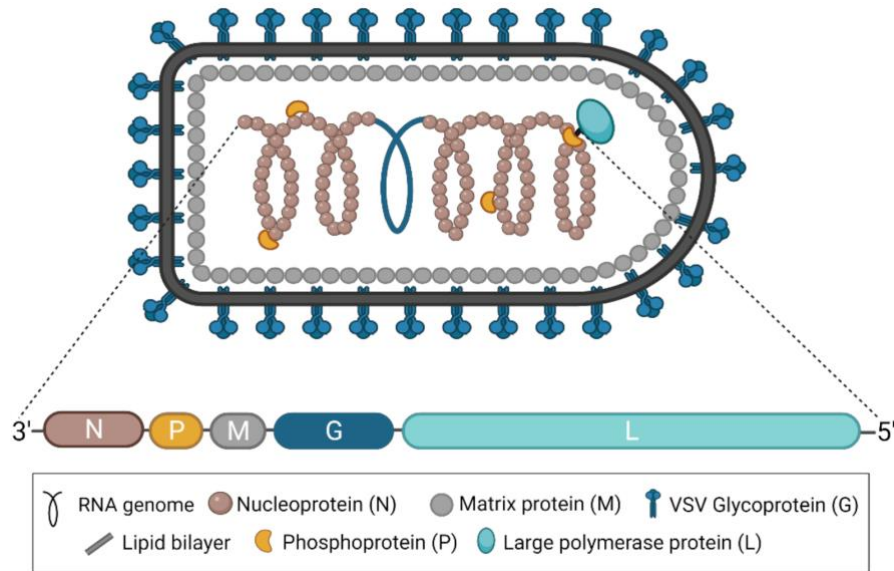


Figure 3.2.1 Modèle de VSV et de son génome

VSV est un virus à ARN de polarité négative. Son génome est composé de 5 parties subgénomiques qui encodent 5 protéines différentes soit la nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P), la protéine de matrice (M), la glycoprotéine (G) et la grande polymérase (L). (*Adapté de Lui et al., 2021*)

La protéine G sert à la liaison à la surface cellulaire de l'hôte et la fusion des membranes virales et cellulaires. Un avantage de VSV G est son tropisme cellulaire qui lie la phosphatidylsérine, une composante presque ubiquitaire à la surface membranaire qui permet l'infection de presque toutes les cellules animales (115,116). En effet, VSV G est très souvent utilisée pour le pseudotypage d'autres virus (116). Cependant, la protéine M est cruciale et a des rôles diversifiés dans la répllication et la pathogenèse de VSV. En effet, la protéine M régule partiellement la transcription des gènes avec la polymérase et fait partie de la machinerie responsable pour le bourgeonnement viral (117,118). Par contre, la fonction la plus importante de la protéine M se fait dans la phase précoce de l'infection où elle permet de contourner les défenses antivirales cellulaires en bloquant l'export nucléaire d'ARNm d'interféron- β (IFN- β) (115,119). La croissance de VSV est fortement inhibée par l'interféron (IFN) d'où l'importance de la protéine M pour la pathogénicité virale (120). Selon l'étude de Stojdl et al. (119), VSV WT induit une réponse antivirale primaire. Toutefois par l'action des produits de gènes viraux, dont la protéine M, les réponses secondaires et tertiaires qui requièrent l'IFN- β sont estropiées par le blocage de l'export nucléaire d'ARNm antiviraux. L'IFN est non seulement important pour les réponses antivirales cellulaires, mais contrôle aussi la croissance cellulaire et l'apoptose. C'est pour cette raison que plusieurs tumeurs ne répondent plus à l'IFN ou développent

des résistances (121). Ces observations ont amené l'idée que les tumeurs peuvent être spécifiquement ciblées pour infection et destruction par des virus qui sont sensibles à l'IFN, comme VSV (122). Étant donné les caractéristiques de VSV, le virus pourrait se répliquer et infecter les cellules cancéreuses, mais en laissant les cellules normales saines et intactes.

Dans la même veine, Stojdl et al. ont créé des OV atténués (AV1 & AV2) par des mutations sur la protéine M. La souche WT et les variantes atténuées sont capables d'induire l'expression des gènes qui encodent l'IFN, mais les variants ne sont pas capables de bloquer l'export de l'ARNm à cause des mutations (119). D'autres équipes de recherches ont montré que les mutations dans la protéine M ne peuvent point être complémentaires par des mutations sur d'autres parties de M ou autres gènes. Seulement un révertant qui permet de convertir l'acide aminé à la position 51, la méthionine, de la protéine de matrice M va donner le phénotype WT (123). En effet, un des variants de VSV le plus utilisé est VSV Δ 51, notre OV modèle, qui a cette délétion de la méthionine à la position 51. La délétion au lieu de la substitution rend la possibilité d'une réversion vers le phénotype WT même après plusieurs rondes de répliquions très improbables et permet à l'OV d'avoir un profil de sécurité plus important. (119,122).

Naturellement, la prochaine étape après l'identification d'un candidat d'OV impressionnant est de le rendre encore plus efficace en gardant le même niveau de sécurité pour les cellules saines. Heureusement, le génome de VSV est facilement modifiable et beaucoup de groupes de recherches essaient de créer de nouvelles stratégies pour améliorer les capacités oncolytiques de VSV. Un prototype de VSV modifié était basé sur l'ajout de ADNc qui encode IL-4 pour augmenter la destruction des tumeurs par la stimulation du système immunitaire (124). Un deuxième prototype de variant VSV était par l'ajout des gènes qui encodent la thymidine kinase et la cytosine désaminase de HSV pour améliorer la destruction de cellules cancéreuses et les rendre sensibles au ganciclovir (124,125). Les deux stratégies ont démontré des effets positifs sur l'oncolyse par VSV tout en gardant la spécificité tumorale du OV. D'autres stratégies se basent plutôt sur la sensibilité de VSV pour l'IFN. Par exemple, un VSV recombinant qui exprime l'ADNc de l'IFN- β a été créé avec l'idée que la croissance dans les cellules normales sera atténuée encore plus, mais qu'il pourrait toujours infecter et détruire les cellules cancéreuses non répondantes/résistantes (126).

3.3 - Les OVs dans le cancer du sein : À l'étude

Le cancer du sein est un des cancers les plus utilisés pour l'étude des OV. Plusieurs différents types d'OVs ont été étudiés que ce soit dans des contextes précliniques ou cliniques avec les adénovirus étant les plus communs (127). Par exemple, le groupe de Liikanen et al. a rapporté l'efficacité d'un adénovirus modifié qui encode un anticorps spécifique pour HER2. Cette plateforme d'adénovirus était capable de tuer des cellules de cancer du sein HER2+ *in vitro* et a démontré les effets antitumoraux contre des tumeurs HER2+ *in vivo* (128). De la même manière, Bergman et al. ont créé un vecteur VSV qui peut cibler spécifiquement les cellules exprimant HER2, puisque le virus a été recouvert par des anticorps contre HER2 qui permet le ciblage direct contre les cellules de cancer du sein surexprimant la protéine oncogénique (129). Niavarani et al. quant à eux ont utilisé VSV pour créer un ICV (vaccins à cellules infectés) et ont utilisé des cellules comme vaccin contre un cancer TNBC (130). ICV est un exemple de traitement personnalisé, car c'est un vaccin de cellules cancéreuses autologues (venant du patient même) inactivées et infectées par un OV qui permet d'exposer le patient à un répertoire de TAA individualisé (131). L'ICV infecté par VSV comparé aux cellules irradiées seules a été plus efficace pour protéger un modèle 4T1 dans des souris. De façon intéressante, l'efficacité de l'ICV infecté par VSV a été augmentée considérablement lorsqu'utilisée en combinaison avec un inhibiteur de PD-1 (130).

En 2010, Diallo et al. ont montré qu'il est possible de combiner des OV (ici spécifiquement VSV) avec des petites molécules qu'ils ont appelées « viral sensitizers » pour améliorer leur croissance et leur efficacité dans des modèles murins et humains. Ils ont l'hypothèse que certaines molécules peuvent affecter des voies de signalisation entières qui imitent les effets de fonctions virales spécifiques (133). Cette stratégie ouvre la porte sur plusieurs possibilités de combinaisons thérapeutiques différentes avec les OV qui n'est pas limitée aux inhibiteurs de points de contrôle. Par exemple, une étude de notre groupe, Bourgeois-Daigneault et al., a montré la compatibilité et la synergie entre le paclitaxel (chimiothérapie) et le OV maraba-MG1 dans des modèles de cancers du sein (133). La thérapie combinée a permis un meilleur contrôle de la tumeur qui s'est traduit par une augmentation significative de la survie dans les modèles étudiés, ainsi qu'une guérison complète dans les modèles de tumeurs murins 4T1 et E0771 (133). Ces résultats ont même introduit la possibilité d'utiliser de plus faibles doses de chimiothérapie, puisque l'effet synergique entre les deux traitements a été observé à des concentrations sublétales

de paclitaxel (133). En conséquence, il sera possible d'envisager moins d'effets secondaires causés par la chimiothérapie systémique toxique tout en gardant des avantages similaires avec la combinaison thérapeutique. L'équipe de Soliman et al. en 2020 s'est servie de cette stratégie dans une étude clinique de phase 1 pour le traitement de cancer du sein TNBC non métastatique (134). En effet, T-VEC a été utilisé en tandem avec la chimiothérapie néoadjuvante sur 9 patientes avec une réponse complète pathologique d'environ 55 % soit (5 sur 9 patientes) sans récurrence à ce jour (134). Il existe même une étude clinique de phase I AWARE-1 (NCT04102618) qui a employé une combinaison de Paleoreorep (Reovirus), du létrozole (thérapie endocrine), atezolizumab (PD-L1) et trastuzumab (anticorps monoclonal HER2) dans des patientes atteintes de cancer du sein précoce opérable. Bref, les OV, surtout VSV, sont une classe d'immunothérapie naissante avec un potentiel unique pour le traitement de cancer à cause des possibilités combinatoires de traitement importants.

Table 1 Oncolytic viruses tested against breast cancer in preclinical studies.

Virus	Modification	Combination	References
Adenovirus	Fiber modified; tissue-specific promoter-driven E1A	None	Bauerschmitz et al. [48]
Adenovirus	Chimeric fiber protein; deletion in E1A gene and encodes trastuzumab	None	Liikanen et al. [49]
Adenovirus	E1A under control of hTERT and E1B under control of HRE promoter; encodes IL-24	None	Zhu et al. [92]
Adenovirus	Modified fiber protein; encodes TGF- β decoy protein	Anti-PD-L1, anti-CTLA-4	Xu et al. [50]
HSV-1	Re-targeted to HER2 by trastuzumab in gD domain; deletion of γ 34.5	None	Menotti et al. [52]
HSV-1	Deletions in α 47, γ 34.5, and ICP6 genes; encodes IL-12	None	Ghouse et al. [54]
VACV	Deleted of J2R, F14.5L, and A56R, and armed with scAb against VEGF	None	Gholami et al. [55]
VACV	J2R gene deleted; encodes IL-15	PI3K δ inhibitor	Ferguson et al. [56]
VACV	J2R replaced with an expression cassette for GM-CSF	Anti-PD-L1, anti-CTLA-4	Chon et al. [57]
VACV	Targeted deletion of immune-modulatory genes	None	Umer et al. [58]
Chimeric poxvirus	Deletions in J2R and F14.5L genes; encodes hNIS gene	Anti-PD-L1	Chaurasiya et al. [87]
VSV	Point mutation in matrix protein	Inactivated cancer cells	Niavarani et al. [59]
VSV	Mutation in matrix protein	Trastuzumab emtansine	Aralanandam et al. [60]
Maraba virus	Mutations in G and M protein	Anti-PD-L1, anti-CTLA-4	Bourgeois-Daigneault et al. [61]
Maraba virus	Mutations in G and M protein	Paclitaxel	Bourgeois-Daigneault et al. [62]
NDV	IL-12 expression cassette inserted between M and F genes	None	Amin et al. [63]
Reovirus	Reassorted reovirus by forward genetics for enhanced infectivity	Topoisomerase inhibitors	Stewart et al. [64]
VSV, Reovirus, HSV, and Ad	Different modifications in different viruses	Surgery	Martin et al. [91]

VSV vesicular stomatitis virus, VACV vaccinia virus, Ad adenovirus, HRE hypoxia response element, PD-L1 programmed death-ligand-1, CTLA-4 cytotoxic T lymphocyte antigen 4, HSV herpes simplex virus, hNIS human sodium iodide symporter, PI3K δ phosphatidylinositol 3-kinase subunit δ , TNBC triple-negative breast cancer, NDV Newcastle disease virus, GM-CSF granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, IL-12 interleukin-12.

Table 2 Oncolytic viruses tested against breast cancer in clinical studies.

Virus	Modification	Combination	Trial phase	RoA*	Country	References
HF10 (HSV-1)	Spontaneously mutated	None	I	i.t.	Japan	Sahn et al. [65]
Pelareorep (Reovirus)	Naturally oncolytic	Paclitaxel	II	i.v.	Canada	Bernstein et al. [66]
Pelareorep (Reovirus)	Naturally oncolytic	Paclitaxel; Avelumab	II	i.v.	USA	NCT04215346
Talimogene laherparepex (HSV-1)	γ 34.5-deleted; encodes GM-CSF	Paclitaxel	I & II	i.t.	USA	NCT02779855
Pexa-Vec (VACV)	Deleted of J2R; encodes GM-CSF	Ipilimumab	I	i.t.	France	NCT02977156
PVSRIP0 (Poliovirus)	Insertion of heterologous IRES from human rhinovirus type 2	None	I	i.t.	USA	NCT03564782
Adenovirus	Encodes HSV-TK	Valacyclovir; Pembrolizumab; radiation therapy	II	i.t.	USA	NCT03004383
Pexa-Vec (VACV)	Deleted of J2R; encodes GM-CSF	Cyclophosphamide	I & II	i.v.	France	NCT02630368
Talimogene laherparepex (Herpes Simplex Virus -1)	γ 34.5 deletion; encode GF-CSF	Ipilimumab; Nivolumab	I	i.t.	USA	NCT04185311
TBo-6517 (Vaccinia virus)	25 kb deletion from the virus genome	Pembrolizumab	I & II	i.t.	USA	NCT04301011
Pelareorep (Reovirus)	Naturally oncolytic	Letrozole; Atezolizumab; Trastuzumab	I	i.v.	Spain	NCT04102618
CAAdVEC (Adenovirus)	24 bp deletion from E1A	HER2 specific CAR T cells	I	i.t.	USA	NCT03740256

RoA route of administration, i.t. intratumoral, i.v. intravenous.

*Indicated RoA is for virus delivery.

Tableau 3.3. Les OV_s utilisés dans les études précliniques et cliniques pour le cancer du sein

Plusieurs OV_s différents seul ou en combinaison sont utilisés dans des modèles précliniques et cliniques pour le traitement du cancer de sein dans différents pays. (Issue de Chaurasiya et al., 2020)

3.4 - Les obstacles et les résistances de la virothérapie

Malheureusement, comme avec n'importe quelle stratégie pour le traitement de cancer, il y a des avantages ainsi que des désavantages ou obstacles qui limitent l'efficacité ou l'utilisation. Comme mentionné auparavant, souvent la carcinogénèse va faire en sorte de rendre les cellules cancéreuses résistantes ou non répondantes à l'IFN (126). Cependant, certains cancers vont être partiellement résistants à l'IFN et vont pouvoir induire les voies de signalisation antivirales pour résister à l'infection par OV (132).

Certaines stratégies sont mises en place pour atténuer la résistance dépendante des cellules tumorales envers les OVés en ciblant les voies de signalisation antivirales induites par l'IFN (135). Néanmoins, l'IFN n'est pas la seule cause de résistance de la virothérapie en cancer. D'autres mécanismes ont été décrits dans la littérature comme étant capables d'atténuer l'efficacité des OVés notamment des modifications épigénétiques, l'inhibition médiée par hypoxie, des résistances médiées par APOBEC (apolipoprotéine B mRNA-editing enzyme) et les compartiments du stroma (ex. cellules myéloïdes, fibroblastes, cellules épithéliales) (136). Des modifications épigénétiques du génome viral ou de l'hôte par APOBEC, protéine antivirale, peuvent être régulées par les cellules tumorales et inhiber la transcription virale (137). D'autres joueurs impliqués dans la résistance sont les cellules stromales, composantes essentielles du TME. Par exemple, les fibroblastes tumoraux qui sont abondants dans les tumeurs solides, mais qui à l'opposé des cellules tumorales, ont des voies de signalisation d'IFN intact qui les rend non permissives à l'infection virale (138). Souvent, les anticorps peuvent poser problème à la virothérapie en neutralisant les OVés thérapeutiques lors de stratégies multidoses ou en cas d'immunisation naturelle (139). Ceci est un avantage de plus pour l'utilisation de VSV puisque l'occurrence d'anticorps spécifiques envers ce rhabdovirus dans la population générale est extrêmement rare (140).

Par contre, un des obstacles majeurs pour l'emploi des OVés est la voie d'administration du traitement. Dans la plupart des études précliniques, une méthode simpliste d'injection locale/régionale (ex. Injection intratumorale—IT) est utilisée pour les tumeurs individualisées (141). Cependant, cette approche n'est pas réaliste pour tous les cancers puisqu'elle ne permet pas de cibler les cancers métastatiques ou les cancers non accessibles. Si à l'opposé, une administration systémique est utilisée, le virus sera bloqué de plusieurs façons, comme la séquestration dans le foie et la rate ainsi que la neutralisation par des facteurs du sérum (141,142). D'autre part, le virus est incapable de traverser les cellules endothéliales qui font partie de la vasculature tumorale (142). Une solution, comme dans l'article de Martinez-Quintanilla et al., est l'utilisation de cellules porteuses (cell carriers) pour apporter le virus dans les tumeurs. En effet, dans cette article, l'auteur a même démontré l'importante stimulation du système immunitaire ainsi que la synergie potentielle avec les ICIs (143). Dans cette même veine, Evgin et al. ont proposé une solution ingénieuse où des cellules T avec un récepteur génétiquement modifié pour cibler un antigène spécifique, CAR T, sont infectées par les OVés pour les

délivrer directement aux tumeurs et éviter les différentes barrières (144). Enfin, les OV sont une thérapie intéressante pour le traitement de différents cancers avec plusieurs avantages. Par contre, il reste toujours des efforts à faire pour surmonter les obstacles pour être un succès thérapeutique. Peut-être qu'une façon d'accomplir ceci serait de regarder dans le TME et voir les facteurs qui permettent une sensibilisation aux OV

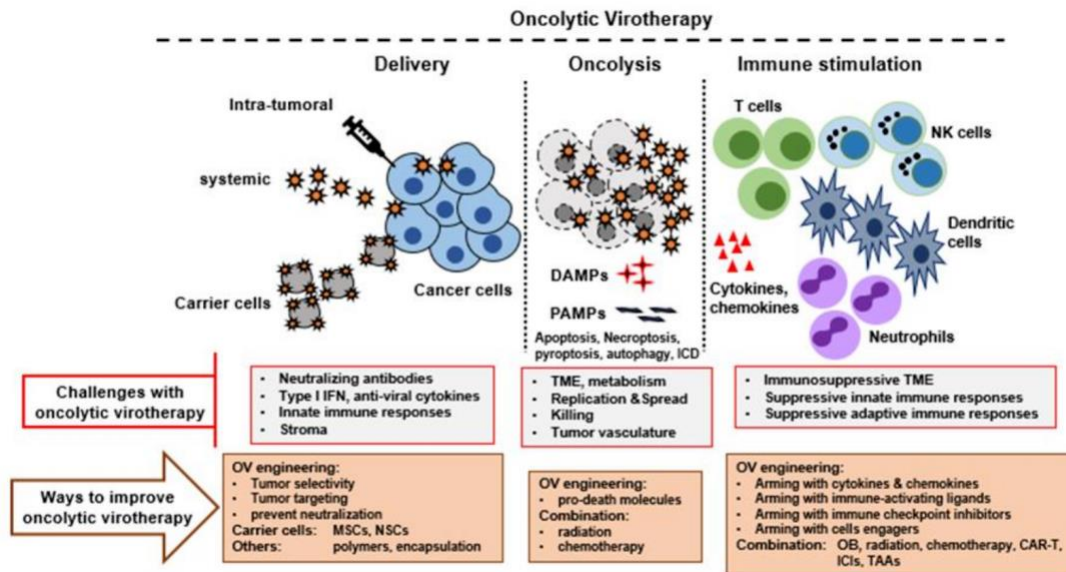


Figure 3.4.1 Résumé des obstacles à l'utilisation de la virothérapie

La virothérapie est une alternative thérapeutique prometteuse, mais il reste des améliorations importantes à faire pour les stratégies thérapeutiques notamment dans la méthode d'administration, l'oncolyse et la capacité de stimuler le système immunitaire. (Issu de Rahman et al., 2021)

Chapitre 4 : Les Estrogènes

4. Facteurs importants dans le TME du cancer du sein : Estrogènes

4.1 - L'estrogène principal : Estradiol (E2)

Un facteur ubiquitaire dans le corps en temps normal ou dans le cancer, surtout le cancer du sein, est la présence d'hormones. Les hormones sont des "messagers chimiques" produits par des organes spécialisés (glandes) qui peuvent agir de façon autocrine ou paracrine sur d'autres parties du corps. Une hormone très importante chez l'humain pour la très grande majorité de la vie et dans le contexte de cancer du sein est l'estrogène, mais plus spécifiquement l'E2. En effet, la concentration d'E2 dans les cellules cancéreuses du sein, qui ont une capacité de synthèse *in situ*, peut atteindre 50-100x plus que les concentrations normales ou en circulation (145). L'estrogène endogène principal, 17 β -estradiol (E2), est une hormone stéroïde associée avec de nombreuses fonctions comme la reproduction, le métabolisme, la santé des os, l'humeur et même la régulation immunitaire (146). La synthèse principale se fait dans les ovaires pour les femmes reproductives (préménopause) par la transformation des androgènes en E2 à l'aide de l'enzyme aromatasase (CYP19A1) (147). Chez les femmes non reproductives (post ménopause), la production de synthèse principale d'estrogène est faite par les tissus adipeux de façon continue (148). Évidemment, les hommes produisent de l'estrogène aussi par les testicules, mais en quantité moindre. L'E2, par des mécanismes génomiques ou non génomiques, va exercer ses nombreuses fonctions par la liaison à son récepteur nucléaire soit le ER α et/ou ER β (149-151). Les deux récepteurs ne sont pas nécessairement trouvés dans les mêmes endroits du corps et peuvent avoir des activités transcriptionnelles différentes qui permettent d'avoir des actions tissu-spécifiques biologiques (150,151). Par contre, dans d'autres tissus, les récepteurs sont colocalisés, donc il est possible d'avoir un chevauchement entre les fonctions des différents récepteurs d'estrogènes (152).

Il existe 4 voies de signalisation décrites exhaustivement par le groupe de Cui et al. par lesquelles l'estrogène peut exercer ses fonctions en liant les ER : (I) voie ER-dépendant nucléaire (II) voie ER-dépendant membranaire (III) voie ER-indépendant (IV) activation ER ligand indépendant (153). Tous ces voies sont décrites sommairement dans la figure 4.1.1. Très brièvement, la voie ER-dépendant nucléaire est médiée à travers les ERs classiques qui induit des changements transcriptionnels chez les gènes sensibles

aux estrogènes avec ou sans éléments de réponses aux estrogènes. La deuxième voie ER-dépendant membranaire mène à plusieurs effets divers cytoplasmiques dont la régulation de messagers secondaires et des canaux ioniques membranaires ainsi que des modifications de facteurs de transcription ou autres récepteurs membranaires. Finalement, la troisième (voie ER-indépendant) et quatrième voie (ER ligand indépendant) de signalisation de l'estrogène exercent des effets antioxydants et permet l'activation de cascades de protéine kinases par des facteurs de croissances qui mènent à l'activation des ERs nucléaires aux éléments de réponse aux estrogènes respectivement. (153).

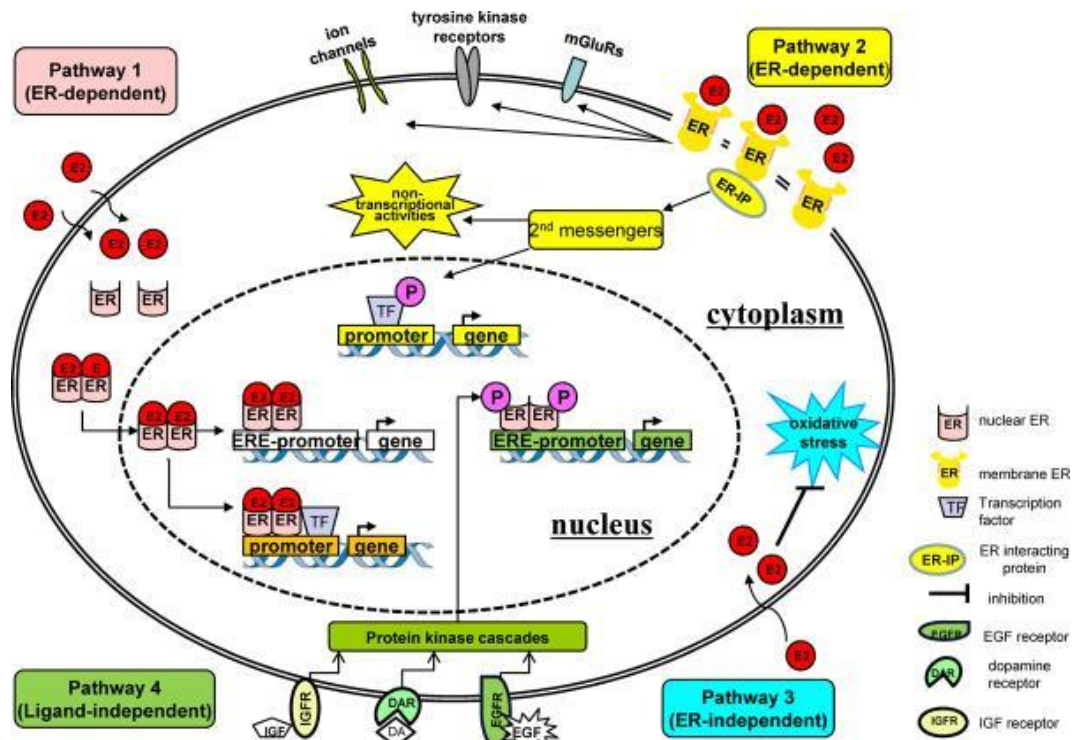


Figure 4.1.1 Les voies de signalisations de l'estradiol (E2)

Il existe 4 voies de signalisation par l'ER. La liaison de l'estrogène à son récepteur va permettre la signalisation ER-dépendante. Cependant, il existe des voies de signalisation ER-indépendante sans la liaison de l'estrogène à son récepteur. (Issu de Cui et al., 2013)

Cependant, il existe d'autres récepteurs qui ont comme ligand l'estrogène notamment le GPER (G protein-coupled estrogen receptor). Le GPER quant à lui est un récepteur estrogénique membranaire avec des conséquences importantes dans la biologie du cancer par des voies ER-indépendantes (154,155). En effet, le GPER est fortement exprimé dans les cancers du sein TNBC comparé aux cancers du sein ER+ (154). De façon intéressante, un autre récepteur nucléaire, le ERR α (estrogen-related receptor α), est très homologue avec l'ER α classique même si l'E2 n'est pas son ligand

naturel (155). Le $ERR\alpha$ a un effet très important sur le métabolisme et certaines études semblent démontrer que la famille des ERRs peut promouvoir la migration et l'invasion cellulaire en régulant l'effet Warburg et des gènes associés au métabolisme (156,157). D'autre part, Li et al. ont démontré que les concentrations physiologiques d'E2 peuvent réguler l'expression de $ERR\alpha$ dans la lignée de cancer du sein SKBR3 (ER-/HER2+) qui indique que les ERRs peuvent influencer la réponse estrogénique (158). Bref, il est clair que l'E2 peut exercer de nombreux effets à travers les différentes voies de signalisation ER-dépendant et ER-indépendant ainsi qu'à partir d'autres récepteurs. Cependant, l'E2 n'est pas le seul type d'estrogène qui peut être retrouvé dans le corps humain

4.2 - Les estrogènes secondaires : Estrone (E1) et Estriol (E3)

L'estrone (E1), le plus faible (actif à de plus fortes concentrations seulement) de tous les estrogènes, est la source principale d'estrogène chez les femmes post ménopauses produites dans les ovaires, les glandes surrénales et les tissus adipeux par la conversion des androgènes (159,160). En effet, l'E1 a une très faible activité estrogénique et sert principalement comme précurseur et/ou métabolite de l'E2 (161,162). Cette hormone est souvent utilisée pour l'hormonothérapie de la ménopause (HRT) (161).

L'estriol (E3), un autre estrogène stéroïde faible, est retrouvé presque exclusivement dans les femmes enceintes et est synthétisé par le placenta. En effet, les niveaux d'E3 chez les femmes qui ne sont pas enceintes sont presque indétectables, tandis que chez les femmes enceintes les concentrations circulantes sont comparables à l'E2 (163,164). Souvent utilisé pour l'HRT, l'E3 montre aussi des propriétés anti-inflammatoires et neuroprotectrices dans des études précliniques (165,166). En effet, des chercheurs ont remarqué que chez les femmes enceintes atteintes de sclérose en plaques, lorsque les niveaux de E3 sont les plus importants, il y avait une diminution des récurrences de la maladie. Dans une étude clinique réalisée par Voskuhl et al. (2015), la combinaison d'E3 et glatiramer acétate (Copaxone), médicament utilisé pour le traitement de la sclérose en plaque, a été efficace pour diminuer le taux de récurrence de sclérose en plaques sur une période de 24 mois (167).

E1 et E3 sont des agonistes des $ER\alpha$ s et/ou $ER\beta$ s, mais beaucoup moins puissants comparés à l'E2. En effet, l'E2 est considéré comme étant 10x plus puissant et 100x plus puissant que E1 et E3 respectivement dans des modèles de souris (168). Par

contre, à l'opposé de E1 et E2, l'E3 semble montrer une affinité accrue pour le ER β comparé à ER α (169). D'autre part, en contraste avec E2 et E3, l'E1 est le seul estrogène à ne pas être un ligand du GPER (170). De façon intéressante, E3 quant à lui à de très hautes concentrations semble agir en tant qu'antagoniste du GPER. Une étude a montré que l'E3 est capable d'inhiber la prolifération induite par l'E2 en bloquant le GPER dans un modèle de cancer du sein TNBC (171). Bref, il est possible de voir que les 3 estrogènes "classiques", même s'ils sont tous des ligands des ERs, ont d'autres propriétés biologiques uniques. Cependant, il existe un dernier estrogène peu connu avec des propriétés encore plus intéressantes

4.3 - Nouvelle hormone : Estetrol (E4)

L'E4, le dernier estrogène découvert en 1965, est produit exclusivement par le foie fœtal. Ce n'est que pendant la grossesse où l'hormone est retrouvée à des niveaux détectables avec des concentrations importantes dans le fœtus et de façon moins importante dans la circulation maternelle (172).

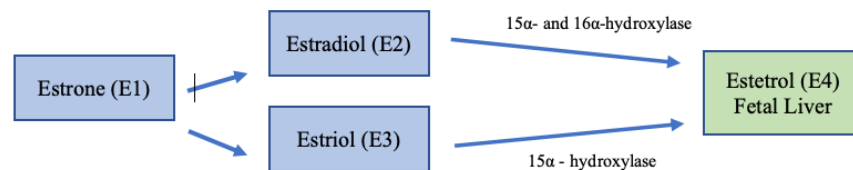


Figure 4.3.1 La synthèse de l'E4 par le foie fœtal

E4 est le 4e type d'estrogène produit exclusivement par le foie fœtal lors de la grossesse avec des caractéristiques uniques. Les concentrations d'E4 sont importantes dans le fœtus et moins dans la circulation maternelle. (Adapté de Schwaiger, 2020)

Comme les 3 autres estrogènes décrits précédemment, E4 est un ligand des récepteurs ER α et/ou ER β , mais agit de manière tissu-spécifique (173). En effet, l'E4 est le premier estrogène à être décrit comme NEST (estrogène natif avec activité tissulaire spécifique), c'est-à-dire qu'il montre des propriétés soit estrogénique, neutre ou anti estrogénique selon les types de cellules ou tissus (174). Dans des modèles de rongeurs, l'E4 montre des capacités estrogéniques sur l'ovulation, le cerveau, les os, le système cardiovasculaire ainsi que l'utérus (175-178). D'autres bénéfices importants sont les activités neutres sur le foie. En effet, l'E4 a très peu d'impact sur les paramètres lipidiques et sur la synthèse de facteurs de coagulations hépatiques qui permettent de diminuer les

effets secondaires souvent associés avec la prise d'estrogène (179). À cause des caractéristiques uniques de l'hormone, un nouveau contraceptif oral combiné (COC) récemment approuvé utilise l'E4 et la drospirénone (Estelle, Nextstellis) (180). Cependant, une des caractéristiques les plus intéressantes, surtout dans le contexte du cancer du sein, c'est l'effet antagoniste de E4 sur le ER en présence de E2. Cet effet anti estrogénique est associé avec une inhibition de la prolifération, la migration et l'invasion de cellules de cancer du sein lorsqu'en présence de l'estradiol (179). L'émergence de l'E4 ouvre des possibilités cliniques intéressantes pour le traitement du cancer du sein et de la prostate. En effet, dans l'étude ABCE4 par l'équipe de Schmidt et al. (2021) de hautes doses d'E4 (HDE4) orales (20 mg, 40 mg et 60 mg) ont été données à 9 patientes atteintes hautement prétraitées de cancer du sein ER+/HER2- localement avancé et/ou métastatique résistant aux antiestrogènes pendant 12 semaines (181). Après les 12 semaines, 5/9 patientes ont montré des effets antitumoraux et 6/9 ont rapporté une augmentation de leur bien-être après des HDE4 sans événements indésirables graves associés aux traitements (181). HDE4 a même été utilisé en combinaison avec la thérapie de privation d'androgènes dans une étude clinique de phase II (PCombi) pour le cancer de la prostate infiltrant ou métastatique sensible à la castration par l'équipe de Bennink et al. L'étude a déterminé que le cotraitement dans le cancer de la prostate avancé à diminuer les bouffées de chaleur, a permis une protection des os ainsi que des effets antitumorales encore une fois sans événements indésirables graves associés au traitement (182). En résumé, il est possible de conclure que certains estrogènes ont des propriétés biologiques uniques qui les rendent des candidats intéressants pour le traitement du cancer du sein. Cependant, il est nécessaire de prendre en considération la façon dont les tumeurs, plus spécifiquement le TME, et le système immunitaire interagissent avec les estrogènes

Estrogènes	Présence	Synthèse	Récepteur	Effet sur les cellules de cancer du sein
Estrone (E1)	Menopause	Tissu adipeux, glande surrénale, ovaires	ER	Oncogénique (surtout par conversion en E2)
Estradiol (E2)	Puberté (↓ Menopause)	Ovaires (surtout)	ER & GPER	Oncogénique sur ER & GPER
Estriol (E3)	Grossesse	Placenta	ER & GPER	Oncogénique sur ER Antagoniste du GPER (hautes concentrations)
Estetrol (E4)	Grossesse	Foie Foetal (exclusivement)	ER & GPER?	Antagoniste du ER lorsqu'en présence d'E2 (NEST)

Tableau 4.3. Résumé des estrogènes

Tableau récapitulatif des différentes caractéristiques de tous les 4 estrogènes comme moment d'apparition, leur synthèse, leur récepteur et l'effet de l'hormone sur les cellules de cancers du sein

4.4 - Estrogènes vs TME & Système immunitaire

Le niveau circulant d'estrogène est un facteur qui va varier beaucoup de patients à patient selon le sexe, l'âge, la diète, l'exercice ainsi que les habitudes de vie (183-184). Évidemment que l'estrogène et l'expression de son récepteur ont un impact important pour les cancers hormono-sensibles tels que le cancer ovarien, cancer du sein et cancer de l'endomètre. Par contre, l'effet de l'estrogène ne se limite pas qu'à ces cancers puisque les voies d'E2 sont associées à presque 30 types de tumeurs différents (185-186). En effet, un essai de criblage à haut débit pour des cancers de poumons humains a déterminé que le fulvestrant, un antiestrogène, est le composé le plus efficace pour améliorer la sensibilité antitumorale ainsi que la lyse à médiation immunitaire (187). Les effets de l'estrogène dans différents cancers sont assez contradictoires. Par exemple, dans les cancers du sein, de l'ovaire et de l'endomètre l'expression nucléaire de ER α est associée avec une meilleure survie par rapport aux cancers ER α -négatif. Tandis que chez d'autres patientes atteintes de cancer du sein ER α -positive, l'expression du récepteur était associée avec une augmentation de la maladie (188-190). L'effet sur la survie de l'expression de l'aromatase et de ER β dans les tumeurs est encore plus controversé. Les opinions des chercheurs pour ses marqueurs sont souvent divisées sûrement dû à un manque d'anticorps ER β standardisés et validés cliniquement (191-193). D'autre part, il y

a une forte expression des ER α/β s sur les cellules immunitaires qui expliquent l'effet régulateur de l'estrogène sur le développement et les réponses fonctionnelles (194). En conséquence, ceci veut dire que la thérapie endocrine utilisée dans le traitement de plusieurs cancers affecte aussi de façon importante le système immunitaire. En effet, l'E2 et les voies de signalisation à partir des ERs peuvent affecter les TILs (cellules infiltrantes la tumeurs), les cellules T cytotoxiques, les NKs (cellules naturellement toxiques), les Tregs (cellules T régulatrices), les cellules stromales, les CAFs (fibroblastes associées au cancer), les TAMs (macrophages associés à la tumeur) et les MDSCs (cellules suppressives dérivées de myéloïdes) (195-201). Cependant, encore une fois les effets estrogéniques (et thérapie endocrine) sur les différentes composantes du système immunitaire sont souvent multiples et contradictoires (202). De façon très généraliste et simpliste, l'estrogène est associé à des voies pro tumorales et permet l'évasion immunitaire. En conséquence, la thérapie endocrine pourrait permettre de réduire l'immunosuppression dans le TME tout en augmentant la réactivité tumorale sensible à l'E2 (202,203). Les actions de l'E2 sur le TME et le système immunitaire ouvre la porte à une question très intéressante qui est comment est-ce que les estrogènes vont affecter la virothérapie en cancer du sein.

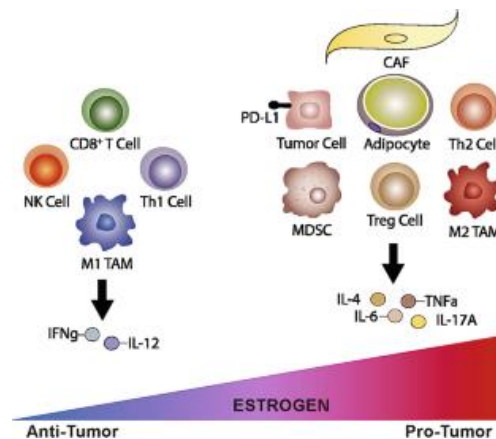


Figure 4.4.1 Effet de la concentration d'estrogène sur le système immunitaire et le TME

De manière générale, l'estrogène est associé à des voies pro tumorales et l'évasion du système immunitaire. (Issu de Somasundaram et al., 2020)

Chapitre 5 : Justification du projet et hypothèse

Les OV sont des virus qui détruisent spécifiquement les cellules cancéreuses et laissent les cellules normales saines intactes. Bien que, les OV ont montré des possibilités cliniques très prometteuses, les patients ne répondent pas toujours positivement à ce traitement. En conséquence, il est nécessaire d'identifier des facteurs qui pourraient prédire des résultats positifs et permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques améliorées. Un facteur ubiquitaire important chez les patients, surtout dans le cancer du sein, est l'E2 une hormone dans le corps humain dont les niveaux varient de personne à personne. En effet, il a été observé par notre équipe que les cancers du sein TNBC qui n'ont pas l'expression du ER et ne répondent pas à la thérapie endocrine sont intrinsèquement plus résistants aux OV. L'étude des cancers du sein et des OV a permis la découverte que les cellules cancéreuses ER+ sont généralement plus sensibles aux OV comparé aux lignées ER-. Notamment, les cellules cancéreuses produisent de l'E2 *in vitro* et les sérums utilisés pour compléter les milieux de culture en contiennent aussi. Pour tester l'effet d'E2 sur les OV, des conditions de culture déplétées d'hormones et de facteurs de croissances avec ou sans ajout d'E2 ont été effectuées. Les lignées ER+ infectées à une faible multiplicité d'infection (MI) dans les conditions déplétées d'E2 ont montré de plus faibles niveaux d'infection. Cependant, lorsque l'E2 a été ajouté, une augmentation des niveaux d'infection de VSV ont été trouvée. Étant donné la difficulté de complètement éliminer l'E2 dans les expériences, des "knock-down" de l'expression des ERs ont été faites par ARN d'interférence. Les résultats ont montré une diminution de la production virale en absence du récepteur. Cela a mené à la découverte que l'E2 permet l'amélioration de la virothérapie dans les cancers du sein ER+ d'une façon ER dépendante.

Notre hypothèse est que les hormones estrogéniques (E1, E2, E3, E4) vont pouvoir moduler l'efficacité des OV et qu'il serait ensuite possible de manipuler ces interactions pour améliorer la réponse à la virothérapie dans le cancer, spécifiquement le cancer du sein.

Nos objectifs sont de déterminer les effets des 4 estrogènes sur VSV dans des lignées de cancer du sein. Ceci va permettre une meilleure sélection de patients pour

lesquels la virothérapie pourrait être un succès ainsi que la conception potentielle d'une nouvelle génération de OV's perfectionné.

L'importance de ces études sont que l'effet des hormones, plus spécifiquement des estrogènes, sur les OV's est peu connu. En prenant en considération l'importance et le rôle de l'estrogène et de ses voies de signalisations dans plusieurs types de cancers différents et sur le système immunitaire, les connaissances issues de ce projet de recherche pourraient avoir un impact clinique important sur l'utilisation clinique des OV's.

Matériel et méthodes

1 - Lignées cellulaires et culture

Les lignées de cancer du sein MCF7 (adénocarcinome métastatique humain), T47D (carcinome de glande mammaire humain) et E0771 (carcinome mammaire murin) (American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)) ont été maintenues en culture dans du Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Corning cellgro, Manassas, VA, USA) supplémenté avec 10% de sérum foetal de boeuf (FBS) et incubé à 37°C avec 5% de CO₂.

2 - Préparations des estrogènes et tamoxifène

L'estrone (E1), l'estradiol (E2), l'estriol (E3), l'estetrol (E4) et le tamoxifène (TAM) ont été achetés de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). L'E1, E2 et E3 avaient une concentration finale de 500 uM. Le TAM avait une concentration finale de 10 mM. L'E4 avait une concentration finale de 100 uM. Tous les composés, sauf pour l'estetrol (E4), ont été dissous dans de l'éthanol, entreposé à -20°C et protégé de la lumière. L'estetrol (E4) a été dissous dans du DMSO. Les concentrations des estrogènes utilisées lors des expériences varient de 0.032 nM jusqu'à 500 nM. Les concentrations de TAM utilisées lors des expériences varient de 5 uM à 100 uM.

3 - Traitement avec les estrogènes

Les lignées de cancer du sein MCF7, T47D et E0771 ont étéensemencés dans des plaques 96 puits à une densité de 25 000 cellules/puit, 50 000 cellules/puit et 100 000 cellules/puit respectivement. Pour les expériences avec des estrogènes, un milieu de culture (DMEM) sans rouge de phénol a été utilisé au moment de l'expérience pour diminuer l'interférence lors de prise de l'intensité de fluorescence, ainsi que l'interaction avec l'ER. Les cellules ont été prétraitées 24 heures avant l'infection avec des concentrations variées de 0.032 nM à 500 nM. Par la suite, les cellules ont été infectées par VSVΔ51-yellow fluorescent protein (YFP) à des multiplicités d'infection (MI) variant de 0.00001 à 0.01 selon l'expérience (voir légendes des figures).

4 - Traitement avec tamoxifène

Les cellules ont étéensemencés dans des plaques 96 puits comme décrit précédemment. Le TAM a été dissous dans de l'éthanol à une concentration finale de 10 mM. Les cellules ont été prétraitées 24 heures avant l'infection avec un gradient de concentrations de tamoxifène variant de 5 μ M à 100 μ M. Ensuite, les cellules ont été infectées par VSV Δ 51-YFP à une MI de 0,01.

5 - Fluorescence et imagerie

La fluorescence de VSV Δ 51-YFP dans les lignées de cancer du sein MCF7, T47D et E0771 24 heures et 48 heures après infection a été déterminée par imagerie de fluorescence (lecteur de plaque à haut débit EnSight de Perkin Elmer) et quantifié à l'aide du programme Kaleido. Les longueurs d'ondes utilisées lors de l'acquisition de la fluorescence des plaques sont de 508.5 nM pour l'excitation et 532 nM pour la longueur d'onde de l'émission. Pour des images à grossissement plus élevée, un imageur de cellules fluorescentes (ZOE de Bio-rad), a aussi été utilisé.

6 – Détermination du titre viral

Les titres viraux ont été mesurés par essai de plaques. Des surnageants des expériences décrites précédemment ont été collectés 24 heures ou 48 heures après l'infection par VSV Δ 51-YFP. Des dilutions en série de ces échantillons ont été transférés sur une monocouche de cellules Vero. Après une incubation de 1 heure, les cellules ont été couvertes avec un mélange de 0.5% d'agarose/DMEM supplémenté avec 10% FBS. Les plaques, représentatives de particules virales infectieuses individuelles, ont été comptées 24 heures plus tard.

7 - Test de viabilité

À 24 heures ou 48 heures après infection, du Resazurin/AlamarBlue (ThermoFisher), un réactif permettant de quantifier le métabolisme, a été ajouté sur les cellules des plaques 96 puits et incubé à 37°C avec 5% de CO₂ pour 4 à 12 heures. Pour la quantification, l'EnSight est utilisé pour déterminer la fluorescence des plaques 96 puits avec le Resazurin/AlamarBlue à partir d'une longueur d'onde d'excitation entre 530-560 nM et une longueur d'onde d'émission de 590 nM.

8 - Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées à partir de GraphPad Prism 9 (voir légendes des figures). Les barres d'erreurs représentent l'erreur-type de la moyenne.

Résultats

1. Effet de l'E2 sur VSVΔ51-YFP

Le premier objectif de cette étude a été de déterminer l'effet de l'E2 à une concentration physiologique, selon la littérature, sur notre virus modèle, VSVΔ51-YFP sur des lignées de cancer du sein humain et murin 24h et 48h post infection.

Les lignées de cancer du sein humain MCF7 et T47D ont été choisies puisqu'elles sont des lignées ER+ très commun avec beaucoup de littérature et d'information dessus. D'autre part, notre laboratoire avait déjà de l'expérience avec ces lignées et l'avait disponible très facilement pour permettre leur utilisation pour les expériences de laboratoire *in vitro*. La lignée de cancer du sein murine E0771 a été utilisée avec l'idée que si l'effet est observable avec ceci *in vitro*, lorsque vient le temps de passer potentiellement à des expériences *in vivo*, une lignée murine facilite beaucoup les manipulations et expériences. Une lignée contrôle non-transformée n'a pas utilisé puisque ceci limite grandement l'utilisation et l'interprétation des données avec notre virus oncolytiques VSVΔ51-YFP, puisque les défenses cellulaires de les lignées ne permettront pas la réplication du virus.

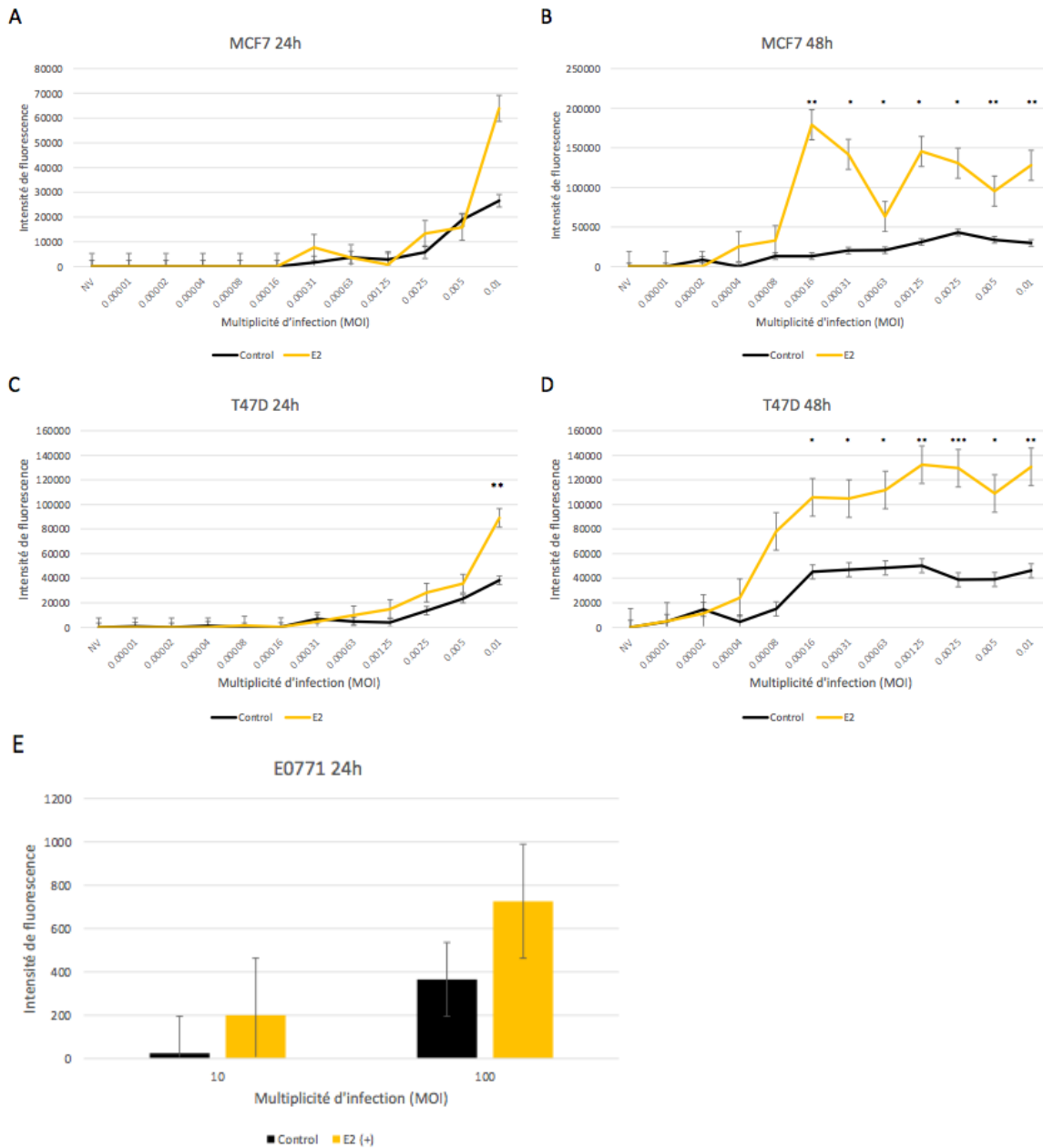


Figure 1. L'E2 augmente la production virale de VSVΔ51-YFP

(A) et (B) Intensité de fluorescence des cellules de cancer du sein MCF7 après prétraitement de 24h avec 100 nM d'E2 ou contrôle (milieu de culture) 24h et 48h après infection par un gradient de MI de VSVΔ51-YFP. (C) et (D) Intensité de fluorescence des cellules de cancer du sein T47D après prétraitement de 24h de 100 nM d'E2 ou contrôle 24h et 48h après infection par un gradient de MI de VSVΔ51-YFP. (E) Intensité de fluorescence des cellules de cancer du sein E0771 après prétraitement de 24h de 100 nM d'E2 ou contrôle 24h après infection par un gradient de MI de VSVΔ51-YFP. L'analyse statistique par one-tailed t test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Réplicat technique : n. Réplicat biologique : N. (A), (B), (C), (D) et (E) : $n = 108$, $N = 3$

Pour déterminer l'effet de l'E2 sur notre OV modèle, VSVΔ51-YFP, une concentration physiologique de 100 nM a été utilisée pour les premières expériences sur 2 lignées de cancer de sein ER+ soit les cellules de cancer du sein humaines MCF7 et

T47D. Avant infection avec VSV, les deux lignées ont été prétraitées avec de l'E2 dans du milieu de culture déplété de tous facteurs de croissance et hormones pendant 24h. Les lignées ont été infectées avec différents MIs de VSV Δ 51-YFP pour observer l'effet de l'hormone sur le virus. Un MI est un ratio entre le nombre de particules virales infectieuses par rapport au nombre de cellules, ici cellules cancéreuses, pouvant être infectées. Par exemple, un MI de 0,01 veut dire qu'il a 100 cellules pour 1 particule virale (infection à plusieurs rondes). Par la suite, 24h et 48h après infection l'intensité de fluorescence a été quantifiée. Dès 24h post infection, il est possible de constater une augmentation de l'intensité de fluorescence aux plus grands MI (ex. 0.005 et 0.01) lorsque les lignées MCF7 (Figure 1A) et T47D (Figure 1C) ont été traitées avec de l'E2 comparé à la condition contrôle. Cependant, à 48h post infection avec VSV Δ 51-YFP, une amplification considérable de presque 3-5 fois plus a été observé pour les cellules MCF7 (Figure 1B) et T47D (Figure 1D) à presque toutes les MIs étudiées lorsque les cellules sont traitées avec l'E2. Puisque c'est le virus VSV Δ 51-YFP qui encode la protéine de fluorescence jaune, une augmentation de la fluorescence correspond à une augmentation de la production de protéine virale par l'OV lorsque les cellules de cancer du sein sont traitées avec de l'E2 en comparaison avec du milieu de culture déplété.

D'autre part, la même expérience a été effectuée sur une lignée de cancer du sein murin E0771. Après un prétraitement de 24h avec 100 nM d'E2 et l'infection par VSV Δ 51-YFP, il est possible d'observer une tendance vers une augmentation non significative de l'intensité de la fluorescence (Figure 1E).

Bref, de ces expériences initiales, il est possible d'observer la tendance que le traitement de cellules de cancer du sein ER+ humaines (MCF7 et T47D) et murines (E0771) avec une concentration physiologique d'E2 (100 nM) suivi d'une infection par VSV Δ 51-YFP a pour effet d'augmenter la production virale.

Il est important de noter que le statut du ER de la lignée de cancer du sein murine E0771 est controversée. Certains articles décrivent la lignée comme étant ER+, tandis que d'autres articles la décrivent comme étant une lignée TNBC. Cependant, plusieurs articles ont démontré une présence de ER+ dans le cytoplasme (204). Comme expliquer précédemment, l'estrogène est capable de signaler à travers des voies différentes, par

exemple des voies cytoplasmiques. De plus, comme les résultats le démontre, il semble que le prétraitement avec l'E2 semble avoir un effet sur l'intensité de fluorescence de la protéine virale. Par exemple par des études sur la signalisation seront possiblement pertinentes pour découvrir ce qui permet de médier l'effet observer, mais ceci sera fait à une date ultérieure.

2. Effet d'un gradient d'E2 sur la production virale et la cytotoxicité de VSV Δ 51-YFP

Après la découverte de l'effet de 100 nM d'E2 sur VSV Δ 51-YFP, la prochaine étape a été de déterminer l'étendue de l'effet d'E2 sur les cellules ER+. Pour ce faire, l'expérience est très similaire à celle décrite précédemment, mais cette fois le prétraitement des cellules par l'E2 s'est faite à différentes concentrations. Par exemple, des concentrations de 500 nM, 5 fois plus que la concentration physiologique (231), jusqu'à des concentrations de 0.032 nM, 3000 fois moins que la concentration physiologique, ont été étudiées. Par la suite, les MCF7 ont été infectées pendant 24h, 48 et 72h à un MI de 0.01.

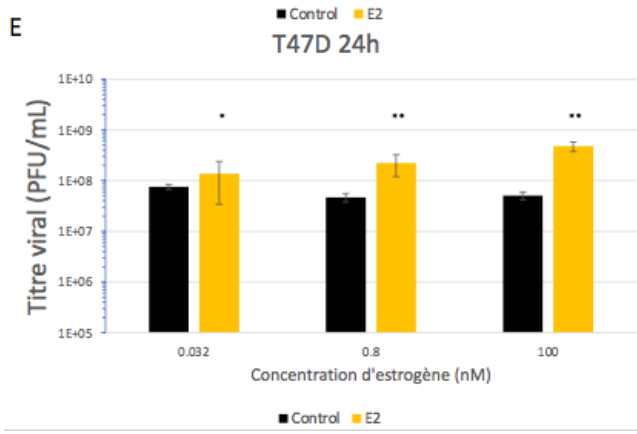
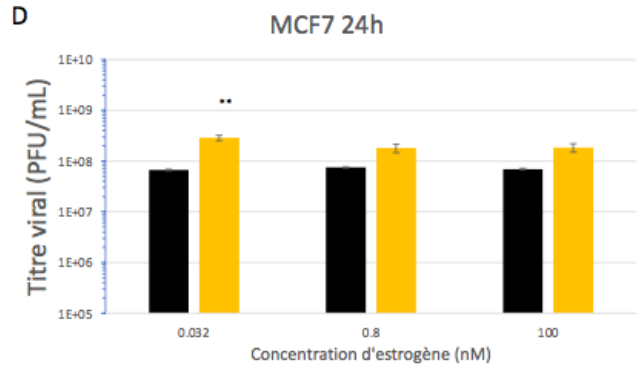
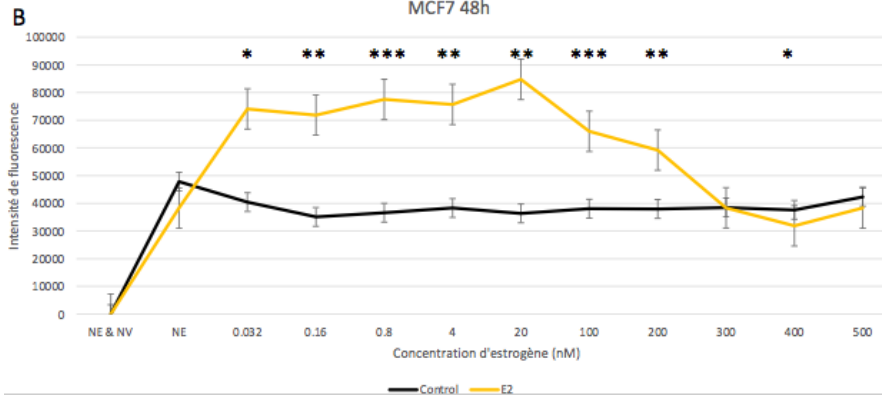
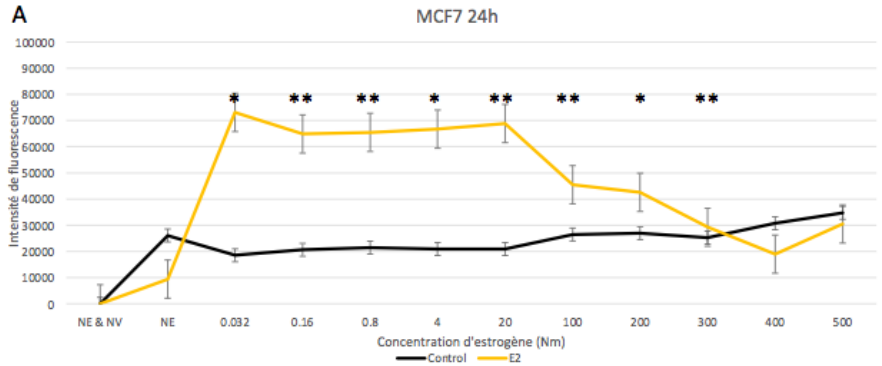




Figure 2. L'E2 augmente la production virale et la cytotoxicité de VSVΔ51-YFP à plusieurs concentrations

(A), (B) et (C) Intensité de fluorescence des cellules de cancer du sein MCF7 après prétraitement de 24h avec un gradient d'E2 (0.032 nM à 500 nM) ou contrôle suivi de 24h, 48h et 72h d'infection par VSVΔ51-YFP (MI 0.01). (D) et (E) Titre viraux de surnageants des cellules MCF7 et T47D 24h après infection. (F) Viabilité des cellules MCF7 par resazurin 24h après infection par VSVΔ51-YFP (MI 0.01) avec un prétraitement d'E2 à différentes concentrations. (G) Intensité de fluorescence des cellules de cancer du sein MCF7 après prétraitement de 24h avec d'E2 à différentes concentrations (0.032 nM à 500 nM) ou contrôle 12 h post infection par VSVΔ51-YFP (MI 0.01). L'analyse statistique par one-tailed t test; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. Réplicat technique : n. Réplicat biologique : N. (A), (B), (C) et (G) : n = 24, N = 3. (D) et (E) : n = 3, N = 2. (F) : n = 24, N = 2

À 24h post infection par VSVΔ51-YFP, il est possible de constater une augmentation significative de plus de 3 fois l'intensité de fluorescence lors du traitement avec les différentes concentrations d'E2 (0.032nM à 200 nM) (Figure 2A). Cette augmentation importante de l'intensité de fluorescence a été maintenue à des taux de fluorescence similaires même 48h et 72h post infection (Figure 2B et 2C). Une autre observation intéressante est que les plus grandes concentrations d'E2 étudiées (300, 400 & 500nM) montrent une diminution drastique de l'intensité de fluorescence. D'autre part, nous avons observés un effet cytotoxique directement sur les cellules qui semblent être causer par les concentrations importantes de l'hormone en question. En effet, ceci semble concorder avec ce qui est déjà connu dans la littérature qui est que des doses importantes d'E2 sont capables d'induire l'apoptose chez les cellules de cancers du sein ER+ (ex. HDE4). Comme des doses importantes d'E2 peuvent causer l'apoptose des cellules cancéreuses, il y a moins de cible pour les OV's pour permettre leur réplication et la production de protéines virales. En conséquence, il aura moins de protéines de fluorescence produites et l'intensité de fluorescence mesurée sera moindre.

D'autre part, l'accroissement de la production de protéines virales correspond à une augmentation significative des titres viraux lorsque les cellules MCF7 et T47D ont été traitées avec différentes concentrations d'E2 (Figure 2D et 2E). Ceci veut dire qu'il a eu une plus grande production de VSVΔ51-YFP dans le surnageant dès 24h post infection lorsque l'E2 est ajouté aux cellules de cancer du sein comparer à l'ajout que de milieu de culture.

De façon intéressante, le prétraitement des cellules avec l'hormone permet une amélioration de la cytotoxicité du OV. À l'aide du resazurin, il est possible de déterminer la viabilité cellulaire. Le resazurin est un indicateur de la prolifération cellulaire et de la viabilité. Lorsque ce composé entre dans des cellules viables, il est réduit et devient très fluorescent ce qui permet une détection facile par un lecteur de plaque par fluorescence. Bref, une cellule vivante pourra réduire le resazurin à l'opposé des cellules mortes permettant une comparaison facile entre les deux conditions. Lors de cette expérience, il est possible de voir que la condition avec différentes concentrations d'E2 suivi par l'infection de VSVΔ51-YFP ont une viabilité relative moindre comparée au contrôle (Figure 2F).

Dans une autre expérience, nous voulons déterminer à quel moment l'effet commence à être induit. Une autre observation est que l'effet de l'E2 sur VSV n'est pas instantané. En effet, à 12h post infection par VSV Δ 51-YFP, l'intensité de fluorescence de la condition contrôle est supérieure à celle des conditions avec les concentrations d'E2 (Figure 2G). Ceci semble indiquer qu'un changement important survient aux cellules de cancer du sein ER+ entre 12h et 24h post infection par l'OV qui a un effet proviral très significatif.

Ces résultats montrent que l'E2, à des concentrations différentes, même extrêmement faibles, est capable de moduler à la hausse la production de VSV Δ 51-YFP et permet une amélioration de l'effet cytotoxique du OV sur les cellules de cancer du sein humaines MCF7 dès 24h post-infection.

3. Effet du blocage du ER sur la réplication virale de VSV Δ 51-YFP

Étant donné l'importance de la présence du ER pour l'effet observé de l'E2 sur VSV Δ 51-YFP, la prochaine étape a été de voir le résultat de bloquer cette cible comme est souvent le cas pour les thérapies endocrines de cancer du sein ER+. Pour ce faire, le tamoxifène (TAM), SERM, a été utilisé puisqu'il lie de façon compétitive le ER. La méthodologie est assez similaire aux expériences décrites précédemment, mais l'E2 a été remplacé par des concentrations différentes de TAM suivi d'infection par VSV Δ 51-YFP.

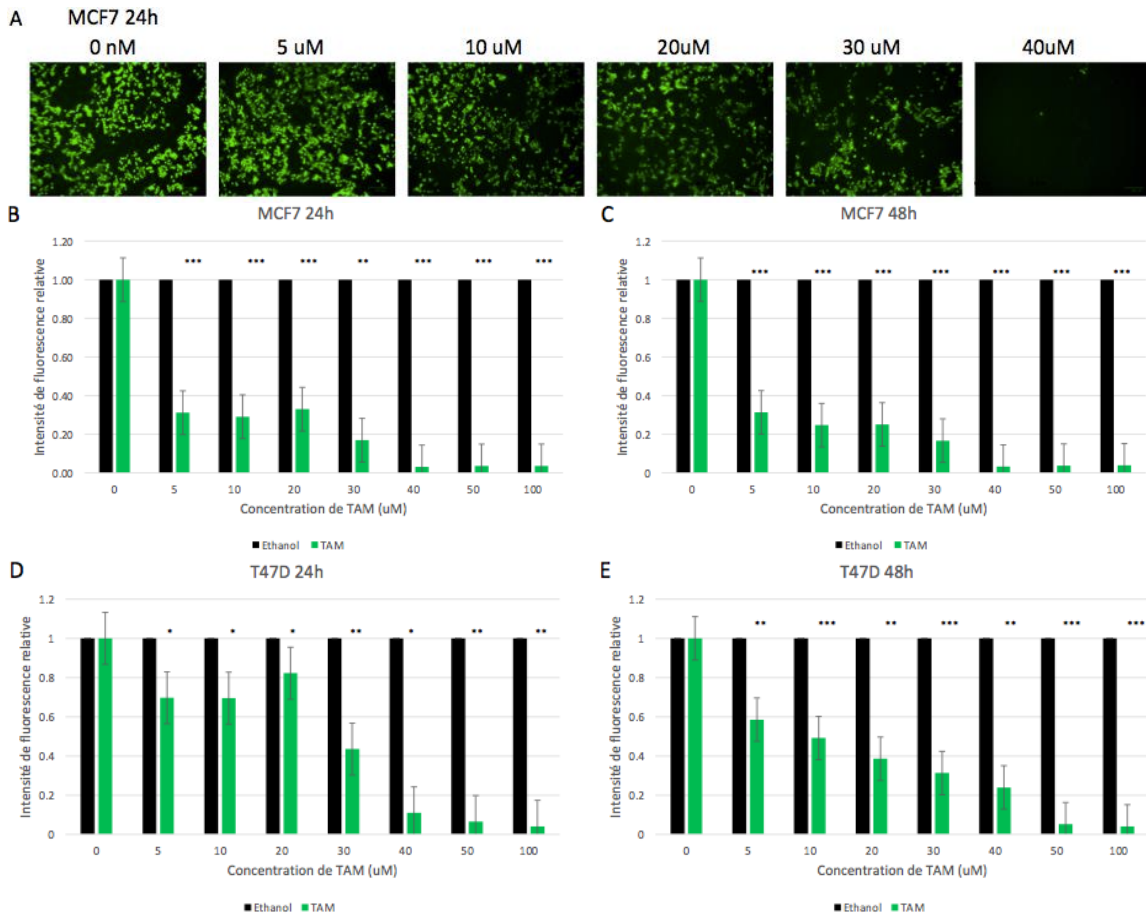


Figure 3. Effet du TAM sur la réplication virale de VSVΔ51-YFP
 (A) Image de microscopie de l'effet de différentes concentrations de TAM sur la réplication virale (intensité de fluorescence) VSVΔ51-YFP dans des cellules MCF7 24h après infection avec un MI de 0.01. (B) et (C) L'intensité de fluorescence relative lors de prétraitement des cellules MCF7 avec différentes concentrations de TAM 24h et 48h après infection par un MI de 0.01 de VSVΔ51-YFP. (D) et (E) L'intensité de fluorescence relative lors de prétraitement des cellules T47D avec différentes concentrations de TAM 24h et 48h après infection par un MI de 0.01 de VSVΔ51-YFP. L'analyse statistique par one-tailed t test; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. Réplicat technique : n. Réplicat biologique : N. (B), (C), (D) et (E) : n = 24, N= 2

Il est possible de voir à l'aide de microscopie fluorescente que le TAM à différentes concentrations (5 uM à 40 uM) a comme effet de diminuer l'intensité de la fluorescence de VSVΔ51-YFP (Figure 3A) comparé à la condition contrôle (0 uM). En effet, dès 24h post infection le traitement des cellules MCF7 (Figure 3B) et T47D (Figure D) avec les concentrations variées de TAM diminue de façon très significative l'intensité de fluorescence relative comparé à la condition contrôle. Cet effet observé du TAM sur VSVΔ51-YFP est maintenu même à 48h post infection par VSVΔ51-YFP (Figure 3C et Figure 3E). De plus, TAM seul à des plus fortes concentrations est capable d'induire l'apoptose chez les cellules de cancer du sein. En effet, des concentrations de 50 uM et

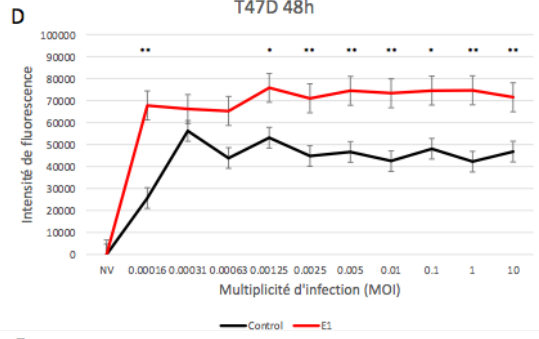
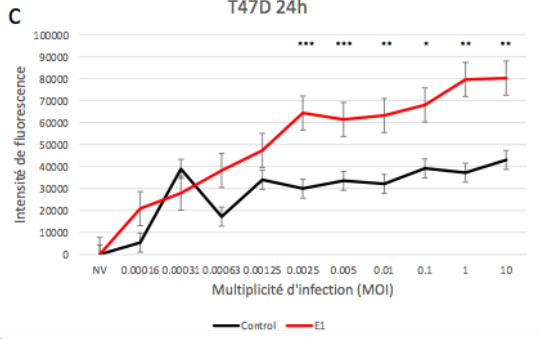
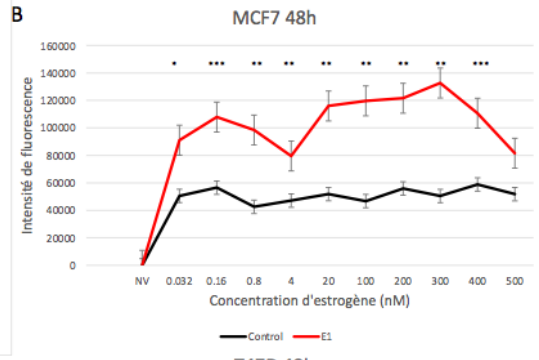
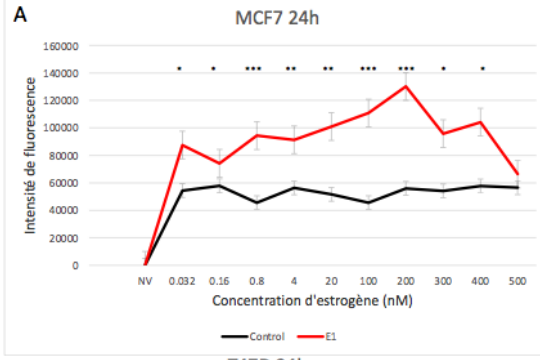
100 μ M de TAM avaient un effet toxique direct sur les cellules cancéreuses même avant l'infection par l'OV qui explique la fluorescence faible à ces concentrations.

Bref, ceci montre encore une l'importance de la présence du ER+ pour l'effet observé, ainsi que l'effet antiviral sur la production virale de VSV Δ 51-YFP lorsque l'E2 ne peut pas lier son récepteur.

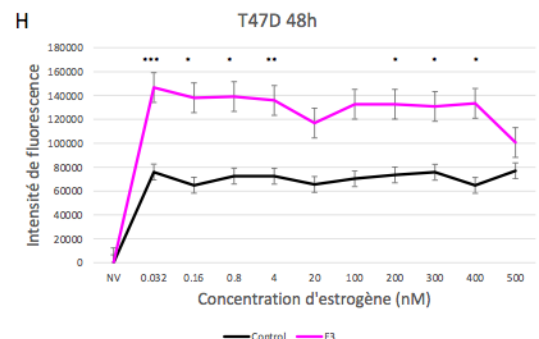
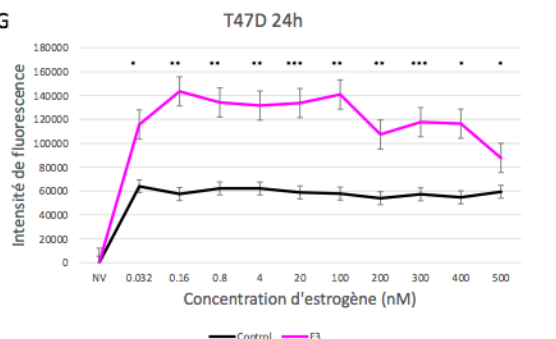
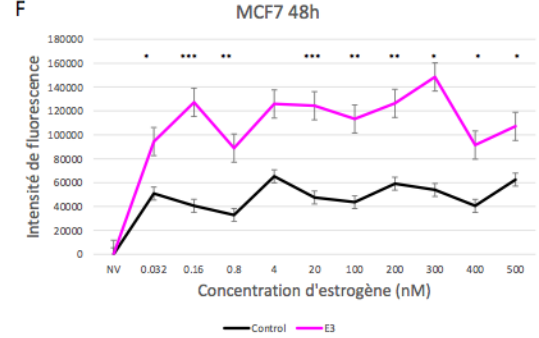
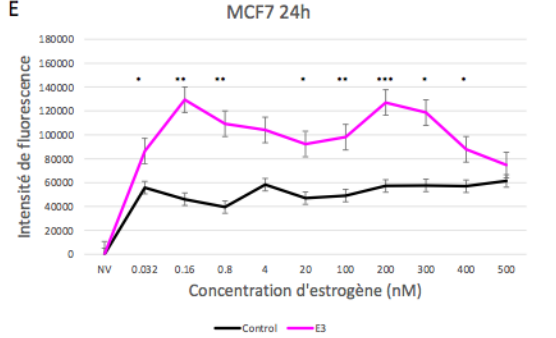
4. Effet des estrogènes secondaires (E1, E3, E4) sur la réplication virale de VSV Δ 51-YFP

Comme décrit antérieurement, l'E2 n'est pas le seul estrogène qui existe. En effet, il y a l'E1, l'E3 et l'E4 qui sont capables de lier l'ER et qui ont tous des caractéristiques biologiques uniques. Il a donc été intéressant de découvrir si ces estrogènes ont la capacité de moduler la production de protéines virales de VSV Δ 51-YFP.

E1



E3



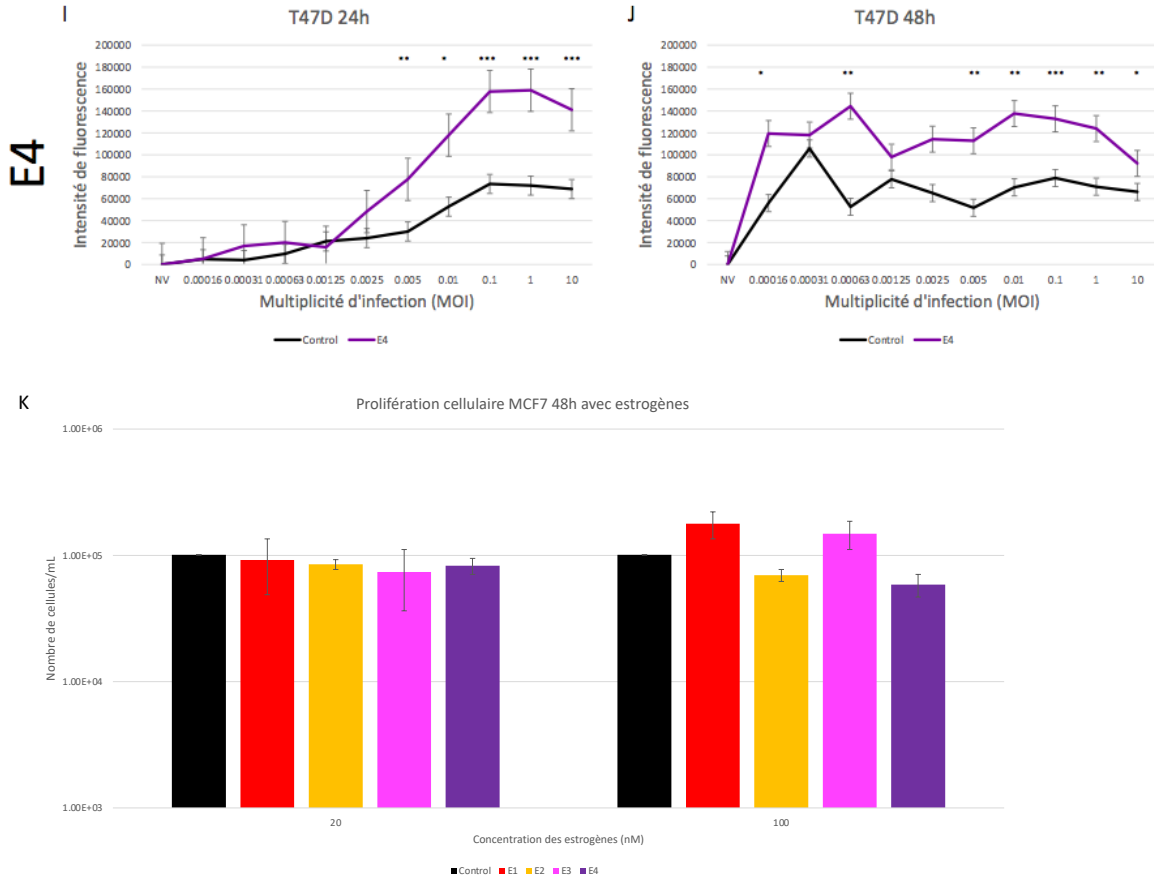


Figure 4. Effets de E1, E3 et E4 sur la réplication virale de VSVΔ51-YFP
 (A) et (B) L'intensité de fluorescence de MCF7 24h et 48h après infection avec un MI 0.01 de VSVΔ51-YFP avec un prétraitement de gradient de concentration de E1. (C) et (D) L'intensité de fluorescence de T47D 24h et 48h après infection avec un gradient de MI de VSVΔ51-YFP et un prétraitement de 100 nM d'E1. (E) et (F) L'intensité de fluorescence de MCF7 24h et 48h après infection avec un MI 0.01 de VSVΔ51-YFP avec un prétraitement de gradient de concentration de E3. (G) et (H) L'intensité de fluorescence de T47D 24h et 48h après infection avec un gradient de MI de VSVΔ51-YFP et un prétraitement de 100 nM d'E3. (I) et (J) L'intensité de fluorescence de T47D 24h et 48h après infection avec un gradient de MI de VSVΔ51-YFP et un prétraitement de 100 nM d'E4. (K) La prolifération cellulaire des cellules de cancer du sein MCF7 après un prétraitement de 48h avec 20 nM et 100 nM des estrogènes (E1, E2, E3, E4). Aucune différence entre les différentes conditions a été trouvée. L'analyse statistique par one-tailed t test; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. Réplicat technique : n. Réplicat biologique : N. (A) à (J) : n = 24, N = 3. (K) : n = 3, N = 2

Pour l'E1, à toutes les concentrations et tous les MIs étudiés, il a eu une augmentation souvent très significative de l'intensité de fluorescence du rhabdovirus et en conséquence une augmentation de protéines virales sur les deux lignées de cancer du sein (Figure 4A à 4D). De la même façon, le traitement avec l'E3 à toutes les concentrations et tous les MIs a eu comme effet des résultats similaires à celles d'E1. C'est-à-dire, une augmentation de la production de protéines virales de l'OV dans les

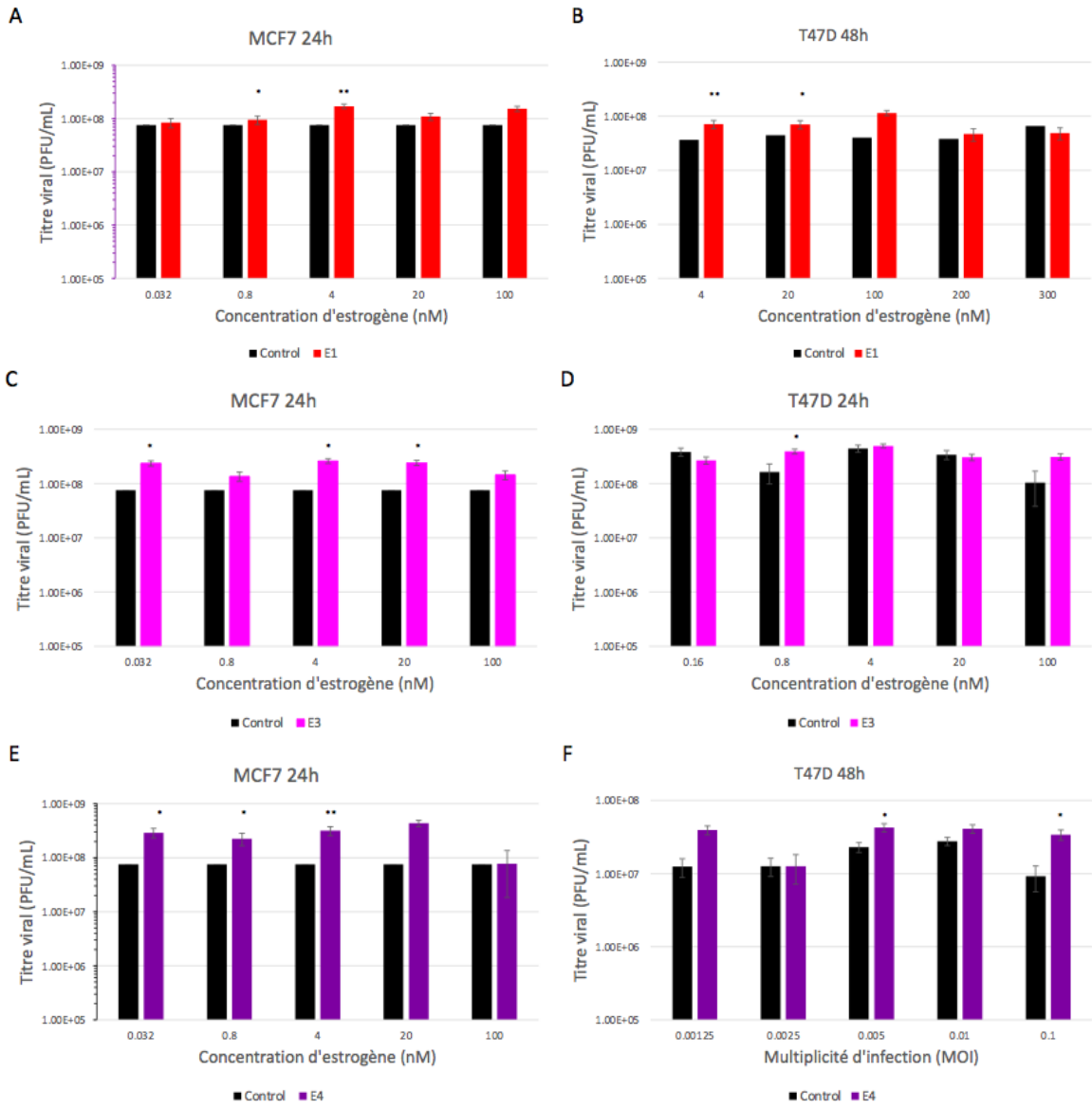
lignées de cancer du sein MCF7 et T47D à 24h et 48h post infection Figure 4E à 4H). Également, même un traitement d'E4, avec toutes ces caractéristiques uniques dans les cellules de cancer du sein, a eu un effet important proviral semblable aux autres estrogènes sur VSVΔ51-YFP 24h et 48h post infection (Figure 4I et 4J).

En outre, comme mentionné auparavant, les estrogènes dans les cancers du sein ER+ ont souvent un effet oncogénique et prolifératif sur les cellules cancéreuses. Il a donc été important de démontrer qu'à 20 nM et 100 nM des estrogènes, il n'a aucune différence de prolifération cellulaire en comparaison avec le contrôle (Figure 4K). Il est donc possible de conclure que l'augmentation de fluorescence n'est pas due à une simple augmentation de la croissance cellulaire, mais plutôt à un changement qui se passe au niveau des cellules.

Bref, il est possible de constater que tous les estrogènes (E1, E2, E3 et E4) ont la capacité de moduler de façon importante la production de VSVΔ51-YFP dans les cancers du sein ER+ humains.

5. L'effet de estrogènes secondaire (E1, E3, E4) sur la production virale et la cytotoxicité de VSVΔ51-YFP

En prenant en compte l'effet de ces estrogènes sur la production de protéines virales lorsque les cellules de cancer du sein sont prétraitées, la prochaine étape était de vérifier leurs effets sur les titres viraux et la viabilité cellulaire lorsqu'utilisés en combinaison avec l'OV.



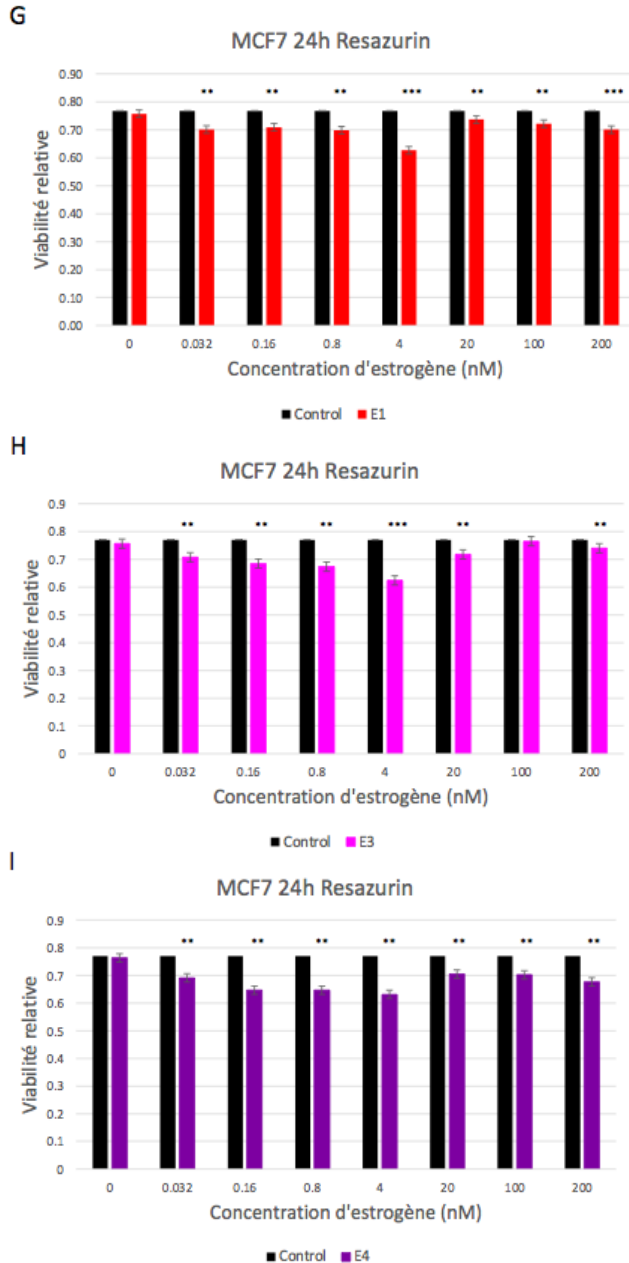


Figure 5. L'effet de E1, E3 et E4 sur la production virale et la cytotoxicité de VSVΔ51-YFP

(A) et (B) Titre viral des cellules MCF7 (24h) et T47D (48h) avec un prétraitement de gradient de concentration d'E1 après infection avec un MI de 0.01 VSVΔ51-YFP. (C) et (D) Titre viral des cellules MCF7 et T47D 24h après infection avec un prétraitement de gradient de concentration d'E3 après infection avec un MI de 0.01 de VSVΔ51-YFP. (E) Titre viral des cellules MCF7 24h après infection avec un MI de 0.01 de VSVΔ51-YFP et un prétraitement de gradient d'E4. (F) Titre viral des cellules T47D 48h après infection avec un gradient de MI de VSVΔ51-YFP avec un prétraitement de 100 nM d'E4. (G), (H) et (I) Viabilité des cellules MCF7 à l'aide de resazurin 24h après infection avec un MI de 0.01 et un prétraitement d'un gradient de concentration de E1, E3 et E4 respectivement. L'analyse statistique par one-tailed t test; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. Réplicat technique : n. Réplicat biologique : N. (A) à (F) : n = 24, N = 3. (G) à (I) : (F) : n = 24, N = 2

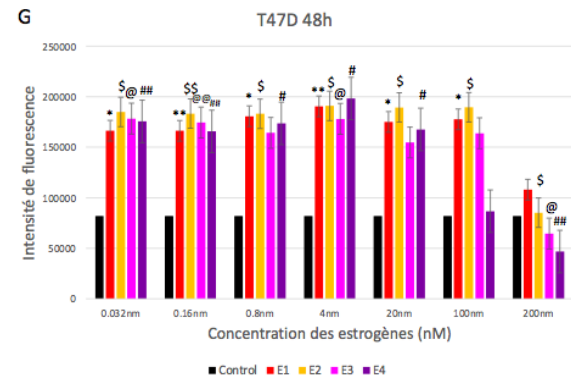
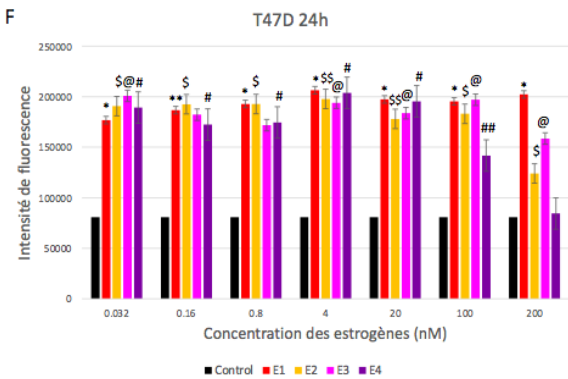
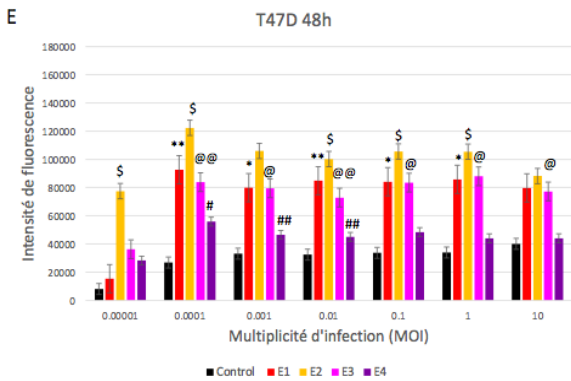
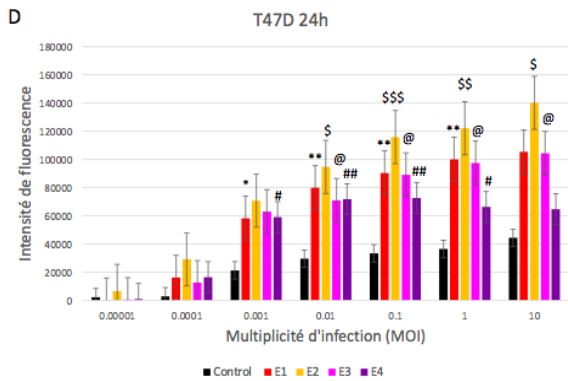
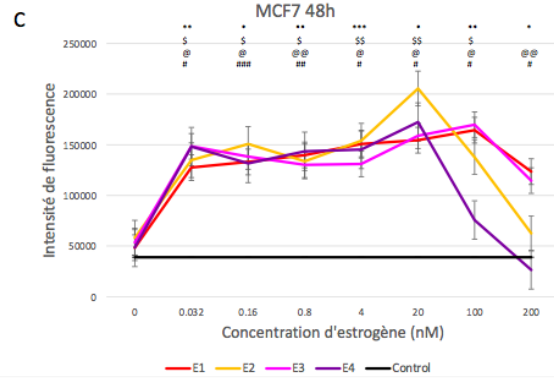
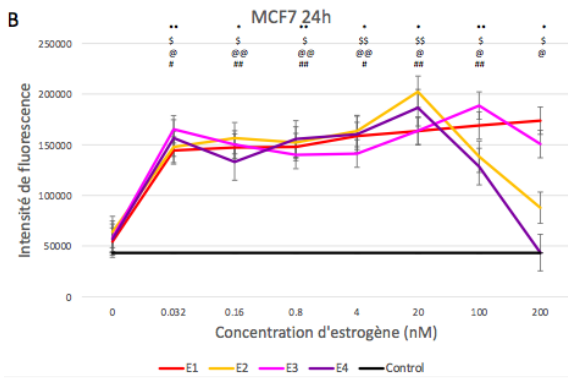
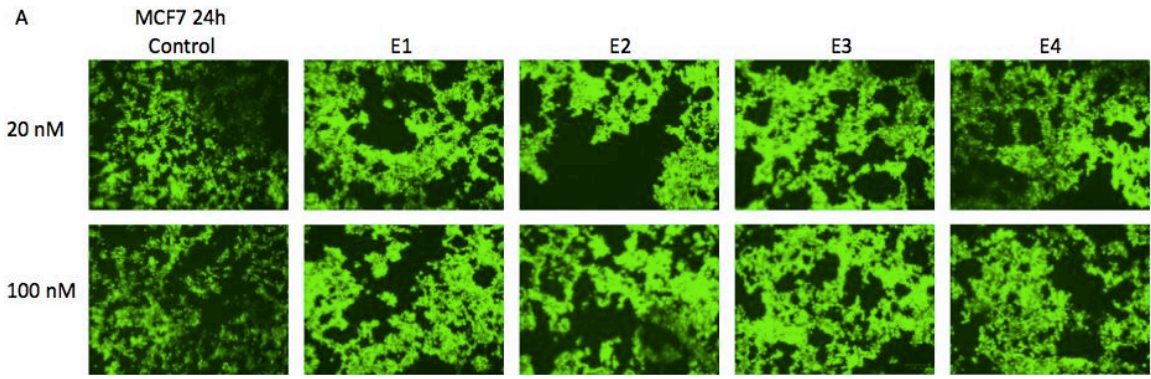
Tous les estrogènes montrent la capacité d'améliorer, souvent de façon significative, la production de VSV Δ 51-YFP que ce soit à différentes concentrations des hormones ou du virus (Figure 5A à 5F). L'importance de cette augmentation peut être observée dans les 2 lignées de cancer du sein (MCF7 et T47D) et aux différents temps étudiés (24h et 48h post infection).

D'autre part, de façon similaire à l'E2, les 3 estrogènes ont démontré une synergie avec l'OV en permettant une augmentation de l'effet cytotoxique du virus. En effet, à toutes les concentrations des hormones étudiées, une diminution significative de la viabilité cellulaire par resazurin a été trouvée lors du traitement des cellules avec les estrogènes comparés au contrôle (Figure 5G à 5I).

En conclusion, nos résultats démontrent que tous les estrogènes (E1, E2, E3 et E4) ont un effet proviral sur VSV Δ 51-YFP lors d'un prétraitement de cellules ER+. Cet effet proviral a comme conséquence une production plus importante du OV ainsi qu'un effet synergique sur l'efficacité de l'oncolyse de VSV Δ 51-YFP dès 24h post infection.

6. Comparaison entre tous les estrogènes sur la production virale et la cytotoxicité de VSV Δ 51-YFP

Finalement, la dernière étape a été de comparer les effets sur VSV Δ 51-YFP des estrogènes entre eux. En effet, l'objectif est de déterminer si l'effet causé par les différents estrogènes ont la capacité d'améliorer la virothérapie de façon semblable ou non.



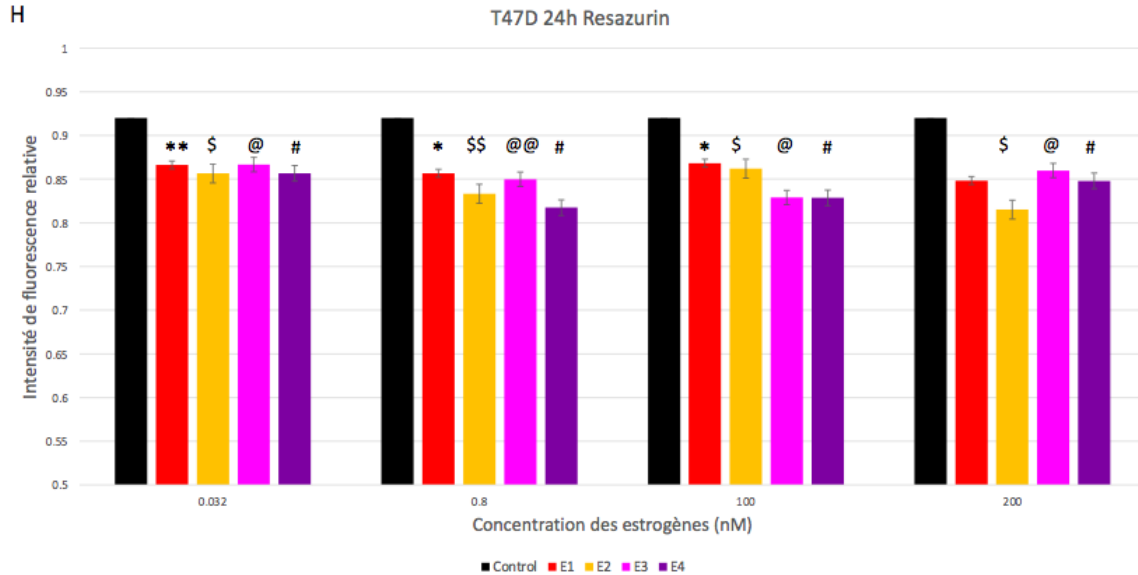


Figure 6. Effet comparatif entre tous les estrogènes (E1, E2, E3, E4) sur la production virale et la cytotoxicité de VSVΔ51-YFP

(A) Image de microscopie de l'effet de différentes concentrations des estrogènes sur la réplication virale (intensité de fluorescence) VSVΔ51-YFP dans des cellules MCF7 24h après infection avec un MI de 0.01. (B) et (C) Intensité de fluorescence des cellules MCF7 24h et 48h après infection avec un MI de 0.01 de VSVΔ51-YFP avec un prétraitement de gradient de concentration de tous les estrogènes. (D) et (E) Intensité de fluorescence des cellules T47D 24h et 48h après infection avec un gradient de MI de VSVΔ51-YFP et un prétraitement de 100 nM de tous les estrogènes. (F) et (G) Intensité de fluorescence des cellules T47D 24h et 48h après infection avec un MI de 0.01 de VSVΔ51-YFP avec un prétraitement de gradient de concentration de tous les estrogènes. (H) Viabilité des cellules T47D par resazurin 24h après infection par VSVΔ51-YFP avec un prétraitement de gradient de tous les estrogènes. L'analyse statistique par one-tailed t test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (* : E1), (\$: E2), (@ : E3), (# : E4). Réplicat technique : n. Réplicat biologique : N. (B) à (G) : n = 6, N = 3. (H) : n = 3, N = 2

À l'aide de microscopie fluorescente, il est possible de conclure visuellement que tous les estrogènes augmentent la fluorescence produite par la protéine YFP encodée par VSV à 20 nM et 100 nM 24h post infection sur MCF7 comparé à du milieu de culture déplété d'hormone (Figure 6A). Même graphiquement, il est possible de constater que tous les estrogènes (E1, E2, E3, E4) doublent de façon comparable l'intensité de fluorescence à toutes les concentrations et tous les MIs (Figure 6B à 6G). Ces résultats sont valides pour les 2 lignées à l'étude soit MCF7 et T47D ainsi que tous les points de temps (24h et 48h post infection). Dans la majorité des cas, l'E2 semble avoir un effet un peu plus important sur la production de protéine virale comparable aux autres estrogènes, mais ceci n'est pas significatif.

De façon intéressante, la viabilité cellulaire de T47D 24h post infection après traitement avec différentes concentrations des estrogènes montrent des résultats qui sont

très similaires pour toutes les conditions estrogéniques étudiées en comparaison avec le contrôle. À partir de ceci, il semble que tous les estrogènes ont un effet synergique sur la cytotoxicité similaire, même si l'E2 semble avoir un effet un peu plus important sur la production virale de VSVΔ51-YFP.

Pour conclure, ceci est une des premières études qui regardent en détail les effets des 4 estrogènes sur la virothérapie du cancer du sein ER+. Les résultats semblent indiquer que tous les estrogènes ont la capacité d'améliorer la production virale de VSVΔ51-YFP et ont un effet synergique sur la cytotoxicité de l'OV. D'autre part, l'étude confirme l'importance du ER pour cet effet proviral observé puisque lorsque le récepteur est bloqué l'effet a été perdu. D'autre part, ces travaux ouvrent la porte sur la possibilité de découvrir les voies de signalisation qui sont affectées pour la création de nouvelles stratégies combinatoires pour le traitement de cancer du sein avec VSVΔ51-YFP et potentiellement d'autres OVs.

Discussion

L'importance de cette étude est que c'est une des premières fois que les effets des hormones estrogéniques sur un OV ont été investigués dans le contexte de cancer du sein avec des implications potentielles cliniques importantes. Le prétraitement de deux lignées de cancer du sein humaines (MCF7 et T47D) avec des estrogènes (E1, E2, E3, E4) a eu comme effet d'amplifier la production de protéines virales et la réplication virale ainsi que l'efficacité de l'oncolyse de VSV. Selon les résultats présentés, il est évident que les estrogènes peuvent moduler de façon importante la virothérapie dans le cancer du sein ER+. Cependant, administrer de l'estrogène, même avec l'effet bénéfique thérapeutique sur VSV, à des patients avec un cancer hormonodépendant (ER+) n'est pas une idée réaliste et sera semblable à mettre de l'huile sur le feu. Comme expliqué précédemment, l'estrogène a un effet oncogénique sur les cancers du sein ER+. Ceci aura comme effet d'augmenter la croissance du cancer chez ces patients. Un des seuls estrogènes qui pourrait possiblement être administré dans ce contexte est l'E4 à cause de son effet antiestrogénique en présence d'E2 sur les cellules de cancer du sein. Comme expliqué antérieurement, il y a des études qui utilisent HDE4, des hautes doses d'E4, en combinaison avec d'autres thérapies comme traitement pour le cancer du sein et le cancer de la prostate qui montrent des résultats prometteurs. Par contre, il n'existe pas pour le moment beaucoup d'études de son utilisation en tandem avec des OVs. Pour justifier son utilisation en clinique en combinaison avec des OVs plus d'études cliniques sont nécessaires pour assurer la sécurité du traitement. D'autre part, les cancers du sein ER- ou les cancers TNBC ne pourront pas bénéficier de l'effet sur l'OV puisque ceci dépend de la présence de l'ER. Encore plus, les résultats semblent montrer un manque de synergie potentielle entre l'utilisation de VSV et les thérapies endocrines qui ciblent l'ER ou diminuent les niveaux d'estrogènes. Tout ceci étant dit, beaucoup d'études sont nécessaires pour le développement d'un traitement viable avec des OVs dans les cancers du sein. Par contre, les résultats restent tout de même très importants et peuvent mener à une façon d'améliorer l'utilisation des OVs dans ces cancers.

Comme mentionné précédemment, le but n'est pas de supplémenter de l'E2 aux patients. Cependant, la présence de l'ER pourrait être utilisée comme biomarqueur pour prédire le potentiel du succès de la thérapie ainsi que la sélection des patients à traiter avec des OVs. Les résultats obtenus par les expériences montrent que des quantités

minimes d'E2 (3000 fois moins que la concentration physiologique) sont suffisantes pour avoir une amplification importante de la réplication virale et un effet synergique sur l'oncolyse dans les cancers du sein ER+. De plus, les cancers hormonodépendants, comme les cancers du sein ER+, acquièrent la capacité de produire eux-mêmes des quantités de l'hormone puisque leur croissance en dépend. Dans cette situation, des traitements complémentaires et compatibles, exemple des ICIs, avec les OV pourront être grandement optimisés avec plus de succès. Par exemple, comme les OV semblent fonctionner de manière plus efficace en présence des estrogènes, leurs bénéfices sur le système immunitaire et les modifications du TME pourraient potentiellement être amplifiés.

Les connaissances acquises par cette étude pourraient grandement affecter les thérapies géniques. Brièvement, le but de la thérapie génique est d'introduire/livrer un gène d'intérêt dans les cellules cancéreuses qui va les tuer directement ou indirectement. Comme les résultats ont démontré, il y a eu une plus grande production de la protéine virale fluorescente en présence de l'E2. Cependant, dans des stratégies de thérapie génique avec OV, la protéine fluorescente sera remplacée par un autre gène d'intérêt qui va permettre de tuer les cellules cancéreuses. Il est donc tout à fait envisageable que dans un milieu avec des estrogènes et la présence de leur récepteur, la production du gène d'intérêt encodé par l'OV serait encore plus efficace et avoir comme résultat l'amélioration du succès du traitement.

Par contre, il est nécessaire de découvrir et comprendre le changement du point de vue moléculaire qui explique l'effet observé. Pour expliquer la sensibilisation des cellules cancéreuses aux OV, les estrogènes doivent soit 1) prévenir l'induction de facteurs antiviraux induits par VSV ou 2) induire l'expression de facteurs proviraux (induites par les estrogènes en présence ou absence de VSV). Notre équipe a des résultats préliminaires de séquençage d'ARN sur les lignées de cancer du sein ER+ MCF7 et ZR75 pour déterminer les gènes potentiels ou les voies de signalisations médiant l'effet sensibilisant aux OV. Dans des expériences menées par mes collègues du laboratoire, l'ARN a été extrait des deux lignées exposées soit à l'E2 seul, le virus seul, la combinaison des deux ou non traité. Évidemment, l'analyse des résultats a montré plusieurs voies induites et inhibées. Par contre, plusieurs voies antivirales ont été inhibées par E2. De façon intéressante, l'analyse des deux lignées individuellement a permis l'identification de

voies de signalisation inhibées de façon significative par E2 en présence de VSV. Certaines de ces voies incluent des cytokines, TNF, récepteurs RIG-I like, récepteurs NOD-like, des TLRs, Jak-STAT et NF- κ B. Curieusement, presque toutes les voies de signalisations convergent directement ou indirectement sur la voie NF- κ B.

NF- κ B est un régulateur important pour les réponses aux différents pathogènes et l'induction de voies antivirales (205). Il permet la stimulation de gènes antiviraux dont l'IFN et des gènes stimulés par l'IFN. De plus, NF- κ B favorise la transcription de gènes viraux qui sont délétères pour la latence de certains virus (206). En effet, à cause de l'importance de NF- κ B sur les réponses cellulaires, plusieurs virus ont développé des stratégies pour cibler NF- κ B et permettre leur réplication. De nombreux sites liant NF- κ B ont été trouvés dans le génome de plusieurs virus dont HIV-1 (virus de l'immunodéficience humaine-1) et différents membres de la famille des virus de l'herpès (207,208). Souvent les différentes stratégies des virus pour moduler les voies de NF- κ B convergent sur l'activation de IKK (I κ B kinase). Il est possible de voir que NF- κ B est fortement impliqué dans les voies antivirales et que les virus essaient de façon active à trouver différentes façons de moduler l'activité de NF- κ B.

L'E2 a été démontré comme étant capable d'inhiber la voie NF- κ B par l'induction de l'inhibiteur de NF- κ B I κ B α et en bloquant la liaison de p65 à l'ADN (209). De plus, l'inhibition de NF- κ B par E2 peut se faire à l'aide des miARNs qui régulent l'expression de K β -Ras2, un inhibiteur de NF- κ B (210). Les résultats obtenus de notre groupe par séquençage d'ARN concordent avec la littérature que l'inhibition de l'activation de NF- κ B peut se faire par l'E2. Cependant, peu est connue dans la littérature concernant l'effet des autres estrogènes (E1, E3, E4) sur NF- κ B. Il est possible que tous les estrogènes puissent à l'aide de l'ER induire les mêmes composants/voies de signalisation qui permettent l'inhibition de NF- κ B, mais ceci reste à être démontré.

NF- κ B est une famille de facteurs de transcription normalement séquestrées dans le cytoplasme formé par 5 protéines distinctes soit RelA (p65), RelB, c-Rel, p100 et p150 (211,212). Les protéines de NF- κ B régulent plusieurs centaines de gènes importants pour l'inflammation, l'immunité, la prolifération et la mort cellulaire (213). L'activation de NF- κ B implique deux voies de signalisation majeures soit la voie canonique ou la voie non canonique (214). La voie canonique peut être activée par plusieurs stimulus et va induire

la dégradation de I κ B α après stimulation par le complexe IKK (214). Le résultat étant la translocation nucléaire des membres canoniques de NF- κ B comme les dimères p50/RelA et p50/c-Rel. Pour sa part, la voie non canonique répond à des stimulus spécifiques comme des ligands de la superfamille de TNFR (214). Dans cette voie, il n'y a pas de dégradation de I κ B α , mais repose sur la modification de la protéine précurseur NF- κ B2, p100. Le résultat final est la génération de NF- κ B2 p52 mature et la translocation nucléaire du complexe p52/RelB (215,216). Une activation dérégulée/constitutive de NF- κ B est une caractéristique souvent associée avec des maladies d'inflammation chronique et des cancers. En effet, dans le cancer du sein l'activité constitutive de NF- κ B est associée avec de l'oncogénèse, la survie cellulaire, la prolifération, l'angiogénèse, des métastases ainsi que la résistance à la chimio- et radiothérapie (217). De façon intéressante, les cancers du sein ER- et TNBC montrent de hauts niveaux d'activation constitutive de NF- κ B (2018).

D'autre part, une étude par Selman et al. (2018) a montré que l'inhibition de NF- κ B peut potentialiser la virothérapie oncolytique. En effet, le groupe de scientifiques a constaté que le diméthyle fumarate et divers esters d'acide fumarique et maléique peuvent amplifier l'infection virale de plusieurs OV's différents dans des lignées de cancers et des biopsies humaines réfractaires aux traitements (219). La capacité du diméthyle fumarate, un traitement commun pour la sclérose en plaques et le psoriasis, d'augmenter la propagation virale est par l'inhibition de la production et des réponses d'IFN type I en bloquant la translocation nucléaire de NF- κ B. Bref, il semble que l'inhibition de l'activation de NF- κ B par les estrogènes pourrait être le mécanisme par lequel les cellules tumorales de cancer du sein deviennent sensibilisées aux OV's.

Un autre aspect majeur qui reste à tester à l'aide d'études subséquentes est si l'effet s'éteint à différents OV's. Dans l'article de Selman et al., ils ont démontré que l'inhibition de la production et des réponses d'IFN type I en bloquant la translocation nucléaire de NF- κ B est efficace pour les rhabdovirus (VSV), pour les adénovirus, les HSVs ainsi que les virus Sindbis (219). Par contre, ce ne sont pas tous les OV's qui vont avoir leur croissance fortement inhibée par l'IFN. D'autre part, comme décrit précédemment, il y a un nombre important d'OV en étude clinique avec différentes caractéristiques. Il sera important de déterminer si l'inhibition de NF- κ B par l'E2 et en conséquence toutes les

voies de signalisation sous la régulation de NF- κ B vont permettre l'effet sensibilisant comme observé pour VSV.

L'importance potentielle de cette voie de signalisation sur l'efficacité des OV ouvre la porte au développement de nouvelles stratégies de OV qui ciblent l'activité de NF- κ B dans les cancers. Le plus important est que ces stratégies vont pouvoir être efficaces indépendamment d'E2 ou de l'ER. C'est-à-dire que ces nouvelles plateformes d'OVs seront potentiellement performantes dans plusieurs cancers différents ainsi que les cancers du sein ER- et TNBC. Par exemple, une option est une combinaison de OV avec un(e) drogue/médicament qui va inhiber l'activation de NF- κ B. Cependant, une chose importante pour le succès de la virothérapie oncolytique est la présence du système immunitaire intact. La prise systémique de drogues/médicaments qui modulent l'activité de NF- κ B pourra affecter les réponses immunitaires, car NF- κ B joue un rôle crucial dans les cellules du système immunitaire et l'inflammation. En effet, NF- κ B régule la survie, l'activation et la différenciation de cellules innées et cellules T inflammatoires comme les cellules dendritiques, les macrophages, les neutrophiles, les cellules T ainsi que les cellules T régulatrices (220).

Par contre, d'autres options plus ciblées pourront être développées pour que l'effet soit concentré que dans la tumeur. Par exemple, il est possible de concevoir un OV qui encode un inhibiteur dominant négatif de NF- κ B, I κ B α 2N (221). Le gène d'intérêt pourrait être introduit entre les protéines virales G et L de VSV qui permet une production du transgène sans affecter la réplication virale (222) Comme c'est l'OV qui encode le transgène d'intérêt qui va inhiber l'activité de NF- κ B, juste les cellules cancéreuses vont être touchées. La raison est que la réplication du OV ne peut se faire que dans la tumeur puisque les cellules saines/normales, avec leurs voies antivirales intactes, vont éliminer l'OV et très peu de transgènes seront produits. Une autre possibilité est de créer des variants de VSV qui peuvent inhiber les différentes sous-unités de NF- κ B en insérant dans le génome viral des shARNs pour cibler efficacement les gènes d'intérêt (223,224). De façon similaire à ce qui a été décrit précédemment de l'effet potentiel important sur la thérapie génique, une situation semblable est possible ici. Par exemple, l'OV va encoder le gène d'intérêt qui va inhiber NF- κ B. Le plus de temps que le virus peut répliquer dans la tumeur, à cause de l'inhibition de NF- κ B par le gène produit, il aura constamment une amélioration de la production de protéine virale (gène d'intérêt) par l'OV. Ceci pourrait

avoir comme conséquence une amélioration exponentielle de ce type de stratégie thérapeutique à l'aide d'OV.

L'avantage de ces combinaisons est l'élargissement de la population de patients qui pourraient bénéficier de l'effet de sensibilisation par E2 (inhibition NF- κ B) aux patients atteints de cancer du sein ER- et TNBC. Comme l'inhibition de NF- κ B est déjà à l'étude comme traitement de cancer du sein agressif et que les OV ont le pouvoir de conférer de l'oncolyse directe, ces stratégies devront avoir une efficacité améliorée. Ces stratégies contournent les incompatibilités entre les OV et les thérapies endocrines standards. D'autre part, l'activation constitutive de NF- κ B est associée avec la résistance à la chimiothérapie, la radiothérapie et la thérapie endocrine. L'inhibition de NF- κ B permet la réversion de ce phénotype et ouvre la possibilité à encore plus de combinaisons de thérapie qui n'étaient pas possibles précédemment. Ces options de VSV innovantes devraient être compatibles pour les patients atteints de cancer du sein ER+ qui reçoivent des drogues/médicaments qui modulent E2/ER.

Il y a toujours la possibilité qu'il soit nécessaire que NF- κ B soit inhibé avant l'infection pour permettre l'effet voulu de sensibilisation virale. Si tel est le cas, l'efficacité des OV modifiés sera affaiblie puisque l'inhibition de la voie de NF- κ B ne sera qu'après infection. Par contre, la combinaison de l'OV et de drogues/médicaments bloquant NF- κ B demeure une option viable avec ce scénario puisqu'il est possible d'administrer les drogues avant les OV.

Un autre aspect important venant de cette étude est la mise en valeur de l'importance et l'effet des hormones sur le système immunitaire et les immunothérapies, comme les OV. L'ER est présent sur plusieurs types de cellules du système immunitaire qui peut moduler les différentes réponses. D'autre part, les voies de signalisations associées à l'E2/ER affectent plusieurs différents types de cancer. Il y a donc un besoin de plus d'études qui regardent les effets de tous les estrogènes, non seulement l'E2, et les récepteurs qui affectent la signalisation de l'estrogène (ex. GPER, ERR) sur l'immunité et sur les OV. De plus, comme c'est le cas avec les estrogènes, il est tout à fait plausible que d'autres hormones aient la capacité de moduler l'efficacité des OV et autre thérapie.

Par exemple, il y a environ 60-70 % des cancers du sein qui sont positifs pour le récepteur de l'androgène (AR), mais l'effet de la signalisation par ce récepteur n'est souvent pas pris en compte de façon clinique lors du traitement (225). En effet, l'AR dans le cancer du sein joue un rôle dans la progression et la métastase. Comme l'ER, l'AR est présent sur les cellules du système immunitaire inné et adaptatif. L'AR et l'androgène peuvent moduler les réponses de différentes cellules immunitaires comme les cellules T, les macrophages, les neutrophiles et d'autres (226). Ce n'est que récemment que des thérapies ciblant l'AR dans des cancers du sein commencent à être utilisées cliniquement. Malheureusement, l'effet des androgènes et de l'AR est peu étudié sur les OV. Bref, l'étude permet de mettre en évidence le besoin de faire plus de recherche sur les hormones en général et leurs effets sur les OV. Ceci pourrait améliorer nos connaissances ainsi que développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour des cancers et maladies hormonodépendants.

Le but ultime est de créer des stratégies d'OV qui peuvent être utilisées efficacement pour plusieurs cancers différents. Cependant, la sécurité du patient reste toujours l'essentiel pour tout traitement. Par exemple, l'administration systémique d'un inhibiteur de NF- κ B ou de façon potentiellement moins importante les plateformes d'OV qui encode un inhibiteur pourrait avoir un effet sur la défense des cellules saines. Si tel est le cas, il y a la possibilité que les OV pourront se répliquer dans les cellules normales aussi qui n'est pas souhaité. C'est pour cette raison que des études exhaustives devront être effectuées sur les combinaisons pour assurer la sécurité et la santé des patients.

Conclusions et perspectives

Les estrogènes sont associés avec des rôles importants et multiples dans le corps dont la reproduction, la santé des os et la santé mentale, ainsi que la régulation du système immunitaire. L'E2 est aussi connu pour avoir des effets importants dans plus de 30 types de cancers différents. Le but de cet ouvrage était de déterminer l'effet des estrogènes (E1, E2, E3 et E4) sur la virothérapie, l'utilisation d'OV qui cible spécifiquement les cellules cancéreuses, dans le cancer du sein. Selon les résultats présentés lors de cette étude, le traitement de cellules de cancer du sein ER+ MCF7 et T47D par tous les estrogènes (E1, E2, E3, E4) ont été capables d'augmenter la production de protéines virales de VSV Δ 51-YFP. Ceci s'est traduit par une augmentation des titres viraux, c'est-à-dire une plus grande production du virus. De plus, la présence des estrogènes a amélioré la capacité cytotoxique du OV sur les cellules cancéreuses par rapport au contrôle. De plus, les résultats ont confirmé l'importance de la présence du ER pour cet effet proviral. Lorsque l'ER a été inhibé de façon compétitive par le traitement des cellules avec du TAM, il y a eu une diminution significative de la production virale et donc un effet antiviral sur VSV Δ 51-YFP. D'autre part, il a été observé que l'effet des estrogènes sur les cellules permettant la sensibilisation des tumeurs aux OVs n'est pas instantanée et nécessite au minimum plus de 12h. Bref, les données indiquent que les estrogènes induisent des changements au niveau cellulaire qui augmentent la production virale et la cytotoxicité de VSV d'une manière dépendante du ER.

L'importance de ces travaux est que c'est une des premières fois que les effets des hormones estrogéniques sont étudiés sur les OVs. Ceci pourrait ouvrir la porte à des études plus poussées sur les mécanismes moléculaires expliquant l'effet observé. Des résultats préliminaires du laboratoire semblent pointer vers un rôle clé de l'inhibition de NF- κ B dans les modifications permettant la sensibilisation des cellules tumorales aux OVs. Cependant, à ce stade-ci, il n'est pas possible de conclure de façon définitive que l'effet observé est dû à l'inhibition de NF- κ B et il reste plusieurs études importantes à faire pour bien démontrer et expliquer l'effet observé.

D'autre part, les résultats pourront avoir des implications cliniques potentielles importantes par exemple en permettant une meilleure sélection de patients pour lesquels ce type de traitement pourrait être efficace. Il y existe la possibilité de générer des

nouvelles stratégies d'OVs optimales, potentiellement en ciblant NF- κ B, pour le traitement de cancer du sein indépendamment de la présence d'E2/ER. Ceci pourrait permettre d'utiliser des plateformes d'OVs optimisées pour le traitement de tous les types de cancer du sein et même potentiellement à d'autres types de cancers.

Références bibliographiques

1. World Health Organisation (WHO). (2022, February). Cancer. 2022 fact sheet. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
2. National Cancer Institute. (2021, May). What is Cancer? — Understanding Cancer. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
3. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
4. Wang, M., Zhao, J., Zhang, L., Wei, F., Lian, Y., Wu, Y., Gong, Z., Zhang, S., Zhou, J., Cao, K., Li, X., Xiong, W., Li, G., Zeng, Z., & Guo, C. (2017). Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *Journal of Cancer*, 8(5), 761–773. <https://doi.org/10.7150/jca.17648>
5. Siddiqui, I. A., Sanna, V., Ahmad, N., Sechi, M., & Mukhtar, H. (2015). Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy: Resveratrol nanoformulations for cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1348(1), 20–31. <https://doi.org/10.1111/nyas.12811>
6. Weston A, Harris CC. Multistage Carcinogenesis. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13982/>
7. Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., & Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: A hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 28. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>
8. American Society of Clinical Oncology (ASCO). (2019, August). Navigating Cancer Care: Cancer Basics - What is Cancer? Available from: <https://www.cancer.net/navigating-cancer-care/cancer-basics/what-cancer>
9. Agulnik, M., & Attia, S. (2018). Growing Role of Regorafenib in the Treatment of Patients with Sarcoma. *Targeted Oncology*, 13(4), 417–422. <https://doi.org/10.1007/s11523-018-0575-0>
10. Leukemia and Lymphoma Society (LLS). (2022). Leukemia — Types of Leukemia. Available from: <https://www.lls.org/leukemia>

11. Lymphoma Research Foundation. (2021). Understanding Lymphoma — About Lymphoma and Lymphoma Subtypes. Available from: <https://lymphoma.org/understanding-lymphoma/aboutlymphoma/>
12. American Cancer Society. (2021, November). About breast cancer. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer.html>
13. Canadian Cancer Society (CCS). (2022, May). Breast Cancer Statistics. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer.html>
14. Gucalp, A., Traina, T. A., Eisner, J. R., Parker, J. S., Selitsky, S. R., Park, B. H., Elias, A. D., Baskin-Bey, E. S., & Cardoso, F. (2019). Male breast cancer: A disease distinct from female breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 173(1), 37–48. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4921-9>
15. Eliyatkin, N., Yalcin, E., Zengel, B., Aktaş, S., & Vardar, E. (2015). Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *Journal of Breast Health*, 11(2), 59–66. <https://doi.org/10.5152/tjbh.2015.1669>
16. Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslén, L. A., Fluge, Ø., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A.-L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
17. He, L., Lv, Y., Song, Y., & Zhang, B. (2019). The prognosis comparison of different molecular subtypes of breast tumors after radiotherapy and the intrinsic reasons for their distinct radiosensitivity. *Cancer Management and Research*, Volume 11, 5765–5775. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S213663>
18. Plesca, M., Bordea, C., El Houcheimi, B., Ichim, E., & Blidaru, A. (2016). Evolution of radical mastectomy for breast cancer. *Journal of Medicine and Life*, 9(2), 183–186.
19. Bland, K. I., Klimberg, V. S., & Copeland, E. M. (2018). Halsted Radical Mastectomy. In *The Breast* (pp. 422-442.e2). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35955-9.00030-1>
20. Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslén, L. A., Fluge, Ø.,

- Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A.-L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
21. Fisher, B., Jeong, J.-H., Anderson, S., Bryant, J., Fisher, E. R., & Wolmark, N. (2002). Twenty-Five-Year Follow-up of a Randomized Trial Comparing Radical Mastectomy, Total Mastectomy, and Total Mastectomy Followed by Irradiation. *New England Journal of Medicine*, 347(8), 567–575. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020128>
22. White, J., Achuthan, R., Turton, P., & Lansdown, M. (2011). Breast Conservation Surgery: State of the Art. *International Journal of Breast Cancer*, 2011, 1–10. <https://doi.org/10.4061/2011/107981>
23. Jin, X., & Mu, P. (2015). Targeting Breast Cancer Metastasis. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 9s1, BCBCR.S25460. <https://doi.org/10.4137/BCBCR.S25460>
24. Hudis, C. A., & Dang, C. T. (2004). Adjuvant Therapy For Breast Cancer: Practical Lessons From The Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Breast Disease*, 21(1), 3–13. <https://doi.org/10.3233/BD-2004-21102>
25. Clarke, M. (2006). Meta-analyses of adjuvant therapies for women with early breast cancer: The Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group overview. *Annals of Oncology*, 17, x59–x62. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdl238>
26. Anampa, J., Makower, D., & Sparano, J. A. (2015). Progress in adjuvant chemotherapy for breast cancer: An overview. *BMC Medicine*, 13(1), 195. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0439-8>
27. Vallis, K. A., & Tannock, I. F. (2004). Postoperative Radiotherapy for Breast Cancer: Growing Evidence for an Impact on Survival. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 96(2), 88–89. <https://doi.org/10.1093/jnci/djh029>
28. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: An overview of the randomised trials. (2005). *The Lancet*, 365(9472), 1687–1717. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66544-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66544-0)
29. Jones, S. E. (2008). Metastatic Breast Cancer: The Treatment Challenge. *Clinical Breast Cancer*, 8(3), 224–233. <https://doi.org/10.3816/CBC.2008.n.025>
30. Slamon, D., Eiermann, W., Robert, N., Pienkowski, T., Martin, M., Press, M., Mackey, J., Glaspy, J., Chan, A., Pawlicki, M., Pinter, T., Valero, V., Liu, M.-C.,

- Sauter, G., von Minckwitz, G., Visco, F., Bee, V., Buyse, M., Bendahmane, B., ... Crown, J. (2011). Adjuvant Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 365(14), 1273–1283.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa0910383>
31. Vranic, S., & Gatalica, Z. (2020). Targeting HER2 expression in cancer: New drugs and new indications. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*.
<https://doi.org/10.17305/bjbms.2020.4908>
32. Partridge, A. H., Rumble, R. B., Carey, L. A., Come, S. E., Davidson, N. E., Di Leo, A., Gralow, J., Hortobagyi, G. N., Moy, B., Yee, D., Brundage, S. B., Danso, M. A., Wilcox, M., & Smith, I. E. (2014). Chemotherapy and Targeted Therapy for Women With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Negative (or unknown) Advanced Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *Journal of Clinical Oncology*, 32(29), 3307–3329.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2014.56.7479>
33. Canadian Cancer Society. (2014, February). Cancer Information: Treatment - Targeted Therapy for Breast Cancer. Available from: <https://cancer.ca/en/cancer-information/cancer-types/breast/treatment/targeted-therapy>
34. Zhang, X., & Munster, P. N. (2014). New protein kinase inhibitors in breast cancer: Afatinib and neratinib. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 15(9), 1277–1288. <https://doi.org/10.1517/14656566.2014.913570>
35. Duchnowska, R., Loibl, S., & Jassem, J. (2018). Tyrosine kinase inhibitors for brain metastases in HER2-positive breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 67, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.05.004>
36. Lee, J. J., Loh, K., & Yap, Y.-S. (2015). PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer. *Cancer Biology & Medicine*, 12(4), 342–354.
<https://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0089>
37. Royce, M. E., & Osman, D. (2015). Everolimus in the Treatment of Metastatic Breast Cancer. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 9, BCBCR.S29268.
<https://doi.org/10.4137/BCBCR.S29268>
38. George, M. A., Qureshi, S., Omene, C., Toppmeyer, D. L., & Ganesan, S. (2021). Clinical and Pharmacologic Differences of CDK4/6 Inhibitors in Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*, 11, 693104. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.693104>
39. Spring, L. M., Zangardi, M. L., Moy, B., & Bardia, A. (2017). Clinical Management of Potential Toxicities and Drug Interactions Related to Cyclin-Dependent Kinase

- 4/6 Inhibitors in Breast Cancer: Practical Considerations and Recommendations. *The Oncologist*, 22(9), 1039–1048. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0142>
40. Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA*, 321(3), 288–300. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>
41. Allison, K. H., Hammond, M. E. H., Dowsett, M., McKernin, S. E., Carey, L. A., Fitzgibbons, P. L., Hayes, D. F., Lakhani, S. R., Chavez-MacGregor, M., Perlmutter, J., Perou, C. M., Regan, M. M., Rimm, D. L., Symmans, W. F., Torlakovic, E. E., Varella, L., Viale, G., Weisberg, T. F., McShane, L. M., & Wolff, A. C. (2020). Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology*, 38(12), 1346–1366. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.02309>
42. Segovia-Mendoza, M., & Morales-Montor, J. (2019). Immune Tumor Microenvironment in Breast Cancer and the Participation of Estrogen and Its Receptors in Cancer Physiopathology. *Frontiers in Immunology*, 10, 348. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00348>
43. Vegeto, E., Ghisletti, S., Meda, C., Eteri, S., Belcredito, S., & Maggi, A. (2004). Regulation of the lipopolysaccharide signal transduction pathway by 17beta-estradiol in macrophage cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 91(1–2), 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.02.004>
44. Kramer, P. R., Kramer, S. F., & Guan, G. (2004). 17 beta-estradiol regulates cytokine release through modulation of CD16 expression in monocytes and monocyte-derived macrophages. *Arthritis and Rheumatism*, 50(6), 1967–1975. <https://doi.org/10.1002/art.20309>
45. Rogers, A., & Eastell, R. (2001). The effect of 17beta-estradiol on production of cytokines in cultures of peripheral blood. *Bone*, 29(1), 30–34. [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(01\)00468-9](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(01)00468-9)
46. Nilsson, N., & Carlsten, H. (1994). Estrogen induces suppression of natural killer cell cytotoxicity and augmentation of polyclonal B cell activation. *Cellular Immunology*, 158(1), 131–139. <https://doi.org/10.1006/cimm.1994.1262>
47. Jiang, X., Ellison, S. J., Alarid, E. T., & Shapiro, D. J. (2007). Interplay between the levels of estrogen and estrogen receptor controls the level of the granzyme inhibitor, proteinase inhibitor 9 and susceptibility to immune surveillance by

- natural killer cells. *Oncogene*, 26(28), 4106–4114.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210197>
48. Laffont, S., Seillet, C., & Guéry, J.-C. (2017). Estrogen Receptor-Dependent Regulation of Dendritic Cell Development and Function. *Frontiers in Immunology*, 8, 108. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00108>
49. Pinkerton, J. V., & Conner, E. A. (2019). Beyond estrogen: Advances in tissue selective estrogen complexes and selective estrogen receptor modulators. *Climacteric: The Journal of the International Menopause Society*, 22(2), 140–147. <https://doi.org/10.1080/13697137.2019.1568403>
50. An, K.-C. (2016). Selective Estrogen Receptor Modulators. *Asian Spine Journal*, 10(4), 787–791. <https://doi.org/10.4184/asj.2016.10.4.787>
51. Song, D., Hu, Y., Diao, B., Miao, R., Zhang, B., Cai, Y., Zeng, H., Zhang, Y., & Hu, X. (2021). Effects of Tamoxifen vs. Toremifene on fatty liver development and lipid profiles in breast Cancer. *BMC Cancer*, 21(1), 798. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08538-5>
52. Pinkerton, J. V. (2021). Selective Estrogen Receptor Modulators in Gynecology Practice. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 64(4), 803–812. <https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000647>
53. Hernando, C., Ortega-Morillo, B., Tapia, M., Moragón, S., Martínez, M. T., Eroles, P., Garrido-Cano, I., Adam-Artigues, A., Lluch, A., Bermejo, B., & Cejalvo, J. M. (2021). Oral Selective Estrogen Receptor Degraders (SERDs) as a Novel Breast Cancer Therapy: Present and Future from a Clinical Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 7812. <https://doi.org/10.3390/ijms22157812>
54. Lu, Y., & Liu, W. (2020). Selective Estrogen Receptor Degraders (SERDs): A Promising Strategy for Estrogen Receptor Positive Endocrine-Resistant Breast Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(24), 15094–15114. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00913>
55. Bidard, F.-C., Kaklamani, V. G., Neven, P., Streich, G., Montero, A. J., Forget, F., Mouret-Reynier, M.-A., Sohn, J. H., Taylor, D., Harnden, K. K., Khong, H., Kocsis, J., Dalenc, F., Dillon, P. M., Babu, S., Waters, S., Deleu, I., García Sáenz, J. A., Bria, E., ... Bardia, A. (2022). Elacestrant (oral selective estrogen receptor degrader) Versus Standard Endocrine Therapy for Estrogen Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Advanced

- Breast Cancer: Results From the Randomized Phase III EMERALD Trial. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 40(28), 3246–3256. <https://doi.org/10.1200/JCO.22.00338>
56. Bui, K. T., Willson, M. L., Goel, S., Beith, J., & Goodwin, A. (2020). Ovarian suppression for adjuvant treatment of hormone receptor-positive early breast cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD013538>
57. Huirne, J. A., & Lambalk, C. B. (2001). Gonadotropin-releasing-hormone-receptor antagonists. *Lancet (London, England)*, 358(9295), 1793–1803.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06797-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06797-6)
58. Singh, G. (2012). Oophorectomy in breast cancer-controversies and current status. *The Indian Journal of Surgery*, 74(3), 210–212.
<https://doi.org/10.1007/s12262-012-0584-7>
59. Johns Hopkins Medicine. Treatment & Services — Endocrine Therapy for Premenopausal Women. Available from:
https://www.hopkinsmedicine.org/kimmel_cancer_center/cancers_we_treat/breast_cancer_program/treatment_and_services/survivorship/endocrine_therapy/premenopausal_women.html
60. Fabian, C. J. (2007). The what, why and how of aromatase inhibitors: Hormonal agents for treatment and prevention of breast cancer: Hormonal agents for treatment and prevention of breast cancer. *International Journal of Clinical Practice*, 61(12), 2051–2063. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2007.01587.x>
61. Conte, P., & Frassoldati, A. (2007). Aromatase inhibitors in the adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: Putting safety issues into perspective. *The Breast Journal*, 13(1), 28–35.
<https://doi.org/10.1111/j.1524-4741.2006.00359.x>
62. Lei, J. T., Anurag, M., Haricharan, S., Gou, X., & Ellis, M. J. (2019). Endocrine therapy resistance: New insights. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 48 Suppl 1(Suppl 1), S26–S30. [https://doi.org/10.1016/S0960-9776\(19\)31118-X](https://doi.org/10.1016/S0960-9776(19)31118-X)
63. Hartmaier, R. J., Trabucco, S. E., Priedigkeit, N., Chung, J. H., Parachoniak, C. A., Vanden Borre, P., Morley, S., Rosenzweig, M., Gay, L. M., Goldberg, M. E., Suh, J., Ali, S. M., Ross, J., Leyland-Jones, B., Young, B., Williams, C., Park, B., Tsai, M., Haley, B., ... Lee, A. V. (2018). Recurrent hyperactive ESR1 fusion proteins in endocrine therapy-resistant breast cancer. *Annals of Oncology*:

- Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 29(4), 872–880.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdy025>
64. Anurag, M., Punturi, N., Hoog, J., Bainbridge, M. N., Ellis, M. J., & Haricharan, S. (2018). Comprehensive Profiling of DNA Repair Defects in Breast Cancer Identifies a Novel Class of Endocrine Therapy Resistance Drivers. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 24(19), 4887–4899. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3702>
65. Miller, T. W. (2013). Endocrine resistance: What do we know? *American Society of Clinical Oncology Educational Book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting*. https://doi.org/10.14694/EdBook_AM.2013.33.e37
66. Hanker, A. B., Sudhan, D. R., & Arteaga, C. L. (2020). Overcoming Endocrine Resistance in Breast Cancer. *Cancer Cell*, 37(4), 496–513.
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.009>
67. Vilquin, P., Cohen, P., Maudelonde, T., Tredan, O., Treilleux, I., Bachelot, T., & Heudel, P.-E. (2015). [New therapeutical strategies in metastatic hormone-dependent breast cancer]. *Bulletin Du Cancer*, 102(4), 367–380.
<https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2015.02.013>
68. Huppert, L. A., Gumusay, O., & Rugo, H. S. (2022). Emerging treatment strategies for metastatic triple-negative breast cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 14, 175883592210869.
<https://doi.org/10.1177/17588359221086916>
69. Anders, C., & Carey, L. A. (2008). Understanding and treating triple-negative breast cancer. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 22(11), 1233–1239; discussion 1239-1240, 1243.
70. Carey, L. A., Dees, E. C., Sawyer, L., Gatti, L., Moore, D. T., Collichio, F., Ollila, D. W., Sartor, C. I., Graham, M. L., & Perou, C. M. (2007). The triple negative paradox: Primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(8), 2329–2334. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1109>
71. Breitbach, C. J., Lichty, B. D., & Bell, J. C. (2016). Oncolytic Viruses: Therapeutics With an Identity Crisis. *EBioMedicine*, 9, 31–36.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.06.046>

72. Cross, D., & Burmester, J. K. (2006). Gene therapy for cancer treatment: Past, present and future. *Clinical Medicine & Research*, 4(3), 218–227.
<https://doi.org/10.3121/cmr.4.3.218>
73. Chaurasiya, S., Hew, P., Crosley, P., Sharon, D., Potts, K., Agopsowicz, K., Long, M., Shi, C., & Hitt, M. M. (2016). Breast cancer gene therapy using an adenovirus encoding human IL-2 under control of mammaglobin promoter/enhancer sequences. *Cancer Gene Therapy*, 23(6), 178–187.
<https://doi.org/10.1038/cgt.2016.18>
74. Aitken, A. S., Roy, D. G., & Bourgeois-Daigneault, M.-C. (2017). Taking a Stab at Cancer; Oncolytic Virus-Mediated Anti-Cancer Vaccination Strategies. *Biomedicines*, 5(1), 3. <https://doi.org/10.3390/biomedicines5010003>
75. Wan, P. K.-T., Ryan, A. J., & Seymour, L. W. (2021). Beyond cancer cells: Targeting the tumor microenvironment with gene therapy and armed oncolytic virus. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 29(5), 1668–1682. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.04.015>
76. Bressy, C., Hastie, E., & Grdzlishvili, V. Z. (2017). Combining Oncolytic Virotherapy with p53 Tumor Suppressor Gene Therapy. *Molecular Therapy Oncolytics*, 5, 20–40. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2017.03.002>
77. Zarogoulidis, P., Darwiche, K., Sakkas, A., Yarmus, L., Huang, H., Li, Q., Freitag, L., Zarogoulidis, K., & Malecki, M. (2013). Suicide Gene Therapy for Cancer—Current Strategies. *Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy*, 4, 16849. <https://doi.org/10.4172/2157-7412.1000139>
78. Majumdar, A. S., Zolotorev, A., Samuel, S., Tran, K., Vertin, B., Hall-Meier, M., Antoni, B. A., Adeline, E., Philip, M., & Philip, R. (2000). Efficacy of herpes simplex virus thymidine kinase in combination with cytokine gene therapy in an experimental metastatic breast cancer model. *Cancer Gene Therapy*, 7(7), 1086–1099. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700215>
79. Brockstedt, D. G., Diagana, M., Zhang, Y., Tran, K., Belmar, N., Meier, M., Yang, A., Boissiere, F., Lin, A., & Chiang, Y. (2002). Development of anti-tumor immunity against a non-immunogenic mammary carcinoma through in vivo somatic GM-CSF, IL-2, and HSVtk combination gene therapy. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 6(5), 627–636.
80. Pandha, H. S., Martin, L. A., Rigg, A., Hurst, H. C., Stamp, G. W., Sikora, K., & Lemoine, N. R. (1999). Genetic prodrug activation therapy for breast cancer: A

- phase I clinical trial of erbB-2-directed suicide gene expression. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 17(7), 2180–2189. <https://doi.org/10.1200/JCO.1999.17.7.2180>
81. Zheng, L., Weilun, Z., Minghong, J., Yaxi, Z., Shilian, L., Yanxin, L., & Dexian, Z. (2012). Adeno-associated virus-mediated doxycycline-regulatable TRAIL expression suppresses growth of human breast carcinoma in nude mice. *BMC Cancer*, 12, 153. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-153>
82. Li, Y. M., Wen, Y., Zhou, B. P., Kuo, H.-P., Ding, Q., & Hung, M.-C. (2003). Enhancement of Bik antitumor effect by Bik mutants. *Cancer Research*, 63(22), 7630–7633.
83. Bargou, R. C., Wagener, C., Bommert, K., Mapara, M. Y., Daniel, P. T., Arnold, W., Dietel, M., Guski, H., Feller, A., Royer, H. D., & Dörken, B. (1996). Overexpression of the death-promoting gene bax-alpha which is downregulated in breast cancer restores sensitivity to different apoptotic stimuli and reduces tumor growth in SCID mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 97(11), 2651–2659. <https://doi.org/10.1172/JCI118715>
84. Rakkar, A. N., Katayose, Y., Kim, M., Craig, C., Ohri, E., Li, Z., Cowan, K. H., & Seth, P. (1999). A novel adenoviral vector expressing human Fas/CD95/APO-1 enhances p53-mediated apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 6(4), 326–333. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400498>
85. Parato, K. A., Senger, D., Forsyth, P. A. J., & Bell, J. C. (2005). Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nature Reviews. Cancer*, 5(12), 965–976. <https://doi.org/10.1038/nrc1750>
86. Filley, A. C., & Dey, M. (2017). Immune System, Friend or Foe of Oncolytic Virotherapy? *Frontiers in Oncology*, 7, 106. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00106>
87. Wakimoto, H., Fulci, G., Tyminski, E., & Chiocca, E. A. (2004). Altered expression of antiviral cytokine mRNAs associated with cyclophosphamide's enhancement of viral oncolysis. *Gene Therapy*, 11(2), 214–223. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302143>
88. Fulci, G., Breyman, L., Gianni, D., Kurozumi, K., Rhee, S. S., Yu, J., Kaur, B., Louis, D. N., Weissleder, R., Caligiuri, M. A., & Chiocca, E. A. (2006). Cyclophosphamide enhances glioma virotherapy by inhibiting innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America*, 103(34), 12873–12878.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0605496103>
89. Prestwich, R. J., Ilett, E. J., Errington, F., Diaz, R. M., Steele, L. P., Kottke, T., Thompson, J., Galivo, F., Harrington, K. J., Pandha, H. S., Selby, P. J., Vile, R. G., & Melcher, A. A. (2009). Immune-Mediated Antitumor Activity of Reovirus Is Required for Therapy and Is Independent of Direct Viral Oncolysis and Replication. *Clinical Cancer Research*, 15(13), 4374–4381.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0334>
90. Irvine, K. R., Chamberlain, R. S., Shulman, E. P., Surman, D. R., Rosenberg, S. A., & Restifo, N. P. (1997). Enhancing Efficacy of Recombinant Anticancer Vaccines With Prime/Boost Regimens That Use Two Different Vectors. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 89(21), 1595–1601.
<https://doi.org/10.1093/jnci/89.21.1595>
91. Guo, Z. S., Liu, Z., & Bartlett, D. L. (2014). Oncolytic Immunotherapy: Dying the Right Way is a Key to Eliciting Potent Antitumor Immunity. *Frontiers in Oncology*, 4, 74. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00074>
92. Chaurasiya, S., Chen, N. G., & Fong, Y. (2018). Oncolytic viruses and immunity. *Current Opinion in Immunology*, 51, 83–90.
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.03.008>
93. Tang, D., Kang, R., Coyne, C. B., Zeh, H. J., & Lotze, M. T. (2012). PAMPs and DAMPs: Signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunological Reviews*, 249(1), 158–175. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x>
94. Workenhe, S. T., & Mossman, K. L. (2014). Oncolytic virotherapy and immunogenic cancer cell death: Sharpening the sword for improved cancer treatment strategies. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 22(2), 251–256. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.220>
95. Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., & Zitvogel, L. (2013). Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annual Review of Immunology*, 31, 51–72.
<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100008>
96. Tesniere, A., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Joza, N., Panaretakis, T., Kepp, O., Schlemmer, F., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2008). Immunogenic cancer cell death: A key-lock paradigm. *Current Opinion in Immunology*, 20(5), 504–511.
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.05.007>

97. Gujar, S., Pol, J. G., Kim, Y., Lee, P. W., & Kroemer, G. (2018). Antitumor Benefits of Antiviral Immunity: An Underappreciated Aspect of Oncolytic Virotherapies. *Trends in Immunology*, 39(3), 209–221.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2017.11.006>
98. Quail, D. F., & Joyce, J. A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*, 19(11), 1423–1437.
<https://doi.org/10.1038/nm.3394>
99. Tower, H., Ruppert, M., & Britt, K. (2019). The Immune Microenvironment of Breast Cancer Progression. *Cancers*, 11(9), 1375.
<https://doi.org/10.3390/cancers11091375>
100. Gujar, S., Pol, J. G., & Kroemer, G. (2018). Heating it up: Oncolytic viruses make tumors “hot” and suitable for checkpoint blockade immunotherapies. *Oncoimmunology*, 7(8), e1442169.
<https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1442169>
101. Franzin, R., Netti, G. S., Spadaccino, F., Porta, C., Gesualdo, L., Stallone, G., Castellano, G., & Ranieri, E. (2020). The Use of Immune Checkpoint Inhibitors in Oncology and the Occurrence of AKI: Where Do We Stand? *Frontiers in Immunology*, 11, 574271.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.574271>
102. Duan, Q., Zhang, H., Zheng, J., & Zhang, L. (2020). Turning Cold into Hot: Firing up the Tumor Microenvironment. *Trends in Cancer*, 6(7), 605–618.
<https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.02.022>
103. Ribas, A., Dummer, R., Puzanov, I., VanderWalde, A., Andtbacka, R. H. I., Michielin, O., Olszanski, A. J., Malvey, J., Cebon, J., Fernandez, E., Kirkwood, J. M., Gajewski, T. F., Chen, L., Gorski, K. S., Anderson, A. A., Diede, S. J., Lassman, M. E., Gansert, J., Hodi, F. S., & Long, G. V. (2018). Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy. *Cell*, 174(4), 1031–1032.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.035>
104. Greig, S. L. (2016). Talimogene Laherparepvec: First Global Approval. *Drugs*, 76(1), 147–154. <https://doi.org/10.1007/s40265-015-0522-7>
105. Cancer Research Institute. (2020, December). Oncolytic Virus Therapy — Immunotherapy with Engineered Viruses to Fight Cancer. Available from:

<https://www.cancerresearch.org/en-us/immunotherapy/treatment-types/oncolytic-virus-therapy>

106. Russell, L., & Peng, K.-W. (2018). The emerging role of oncolytic virus therapy against cancer. *Chinese Clinical Oncology*, 7(2), 16.
<https://doi.org/10.21037/cco.2018.04.04>
107. Bommareddy, P. K., Shettigar, M., & Kaufman, H. L. (2018). Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 18(8), 498–513. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0014-6>
108. Zheng, M., Huang, J., Tong, A., & Yang, H. (2019). Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Barriers and Recent Advances. *Molecular Therapy Oncolytics*, 15, 234–247. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2019.10.007>
109. Lawson, N. D., Stillman, E. A., Whitt, M. A., & Rose, J. K. (1995). Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(10), 4477–4481.
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.10.4477>
110. Bhattacharjee, S., & Yadava, P. K. (2018). Measles virus: Background and oncolytic virotherapy. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 13, 58–62.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.12.004>
111. Israyelyan, A., Chouljenko, V. N., Baghian, A., David, A. T., Kearney, M. T., & Kousoulas, K. G. (2008). Herpes simplex virus type-1(HSV-1) oncolytic and highly fusogenic mutants carrying the NV1020 genomic deletion effectively inhibit primary and metastatic tumors in mice. *Virology Journal*, 5(1), 68.
<https://doi.org/10.1186/1743-422X-5-68>
112. Parato, K. A., Breitbach, C. J., Le Boeuf, F., Wang, J., Storbeck, C., Ilkow, C., Diallo, J.-S., Falls, T., Burns, J., Garcia, V., Kanji, F., Evgin, L., Hu, K., Paradis, F., Knowles, S., Hwang, T.-H., Vanderhyden, B. C., Auer, R., Kirn, D. H., & Bell, J. C. (2012). The oncolytic poxvirus JX-594 selectively replicates in and destroys cancer cells driven by genetic pathways commonly activated in cancers. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 20(4), 749–758. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.276>
113. Wagner, R.R. and Rose, J.K. (1996) Rhabdoviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology* (Fields, B.N. and Knipe, D.M.,eds), pp. 1121 – 1136, Lippincott-Raven

114. Acheson N.H., Kolakofsky D., Richardson C. Paramyxoviruses and Rhabdoviruses. In: Acheson N.H., editor. *Fundamentals of Molecular Virology*. Wiley; Hoboken, NJ, USA: 2011. pp. 173–187.
115. Lichty, B. D., Power, A. T., Stojdl, D. F., & Bell, J. C. (2004). Vesicular stomatitis virus: Re-inventing the bullet. *Trends in Molecular Medicine*, 10(5), 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.03.003>
116. Hastie, E., Cataldi, M., Marriott, I., & Grdzelishvili, V. Z. (2013). Understanding and altering cell tropism of vesicular stomatitis virus. *Virus Research*, 176(1–2), 16–32. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.06.003>
117. Carroll, A. R., & Wagner, R. R. (1979). Role of the membrane (M) protein in endogenous inhibition of in vitro transcription by vesicular stomatitis virus. *Journal of Virology*, 29(1), 134–142. <https://doi.org/10.1128/JVI.29.1.134-142.1979>
118. Harty, R. N., Brown, M. E., McGettigan, J. P., Wang, G., Jayakar, H. R., Huibregtse, J. M., Whitt, M. A., & Schnell, M. J. (2001). Rhabdoviruses and the cellular ubiquitin-proteasome system: A budding interaction. *Journal of Virology*, 75(22), 10623–10629. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.22.10623-10629.2001>
119. Stojdl, D. F., Lichty, B. D., tenOever, B. R., Paterson, J. M., Power, A. T., Knowles, S., Marius, R., Reynard, J., Poliquin, L., Atkins, H., Brown, E. G., Durbin, R. K., Durbin, J. E., Hiscott, J., & Bell, J. C. (2003). VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell*, 4(4), 263–275. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(03\)00241-1](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00241-1)
120. Balachandran, S., & Barber, G. N. (2000). Vesicular stomatitis virus (VSV) therapy of tumors. *IUBMB Life*, 50(2), 135–138. <https://doi.org/10.1080/713803696>
121. Grandér, D., & Einhorn, S. (1998). Interferon and malignant disease—How does it work and why doesn't it always? *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)*, 37(4), 331–338. <https://doi.org/10.1080/028418698430548>
122. Stojdl, D. F., Lichty, B., Knowles, S., Marius, R., Atkins, H., Sonenberg, N., & Bell, J. C. (2000). Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nature Medicine*, 6(7), 821–825. <https://doi.org/10.1038/77558>

123. Coulon, P., Deutsch, V., Lafay, F., Martinet-Edelist, C., Wyers, F., Herman, R. C., & Flamand, A. (1990). Genetic evidence for multiple functions of the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *The Journal of General Virology*, 71 (Pt 4), 991–996. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-4-991>
124. Fernandez, M., Porosnicu, M., Markovic, D., & Barber, G. N. (2002). Genetically engineered vesicular stomatitis virus in gene therapy: Application for treatment of malignant disease. *Journal of Virology*, 76(2), 895–904. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.2.895-904.2002>
125. Porosnicu, M., Mian, A., & Barber, G. N. (2003). The oncolytic effect of recombinant vesicular stomatitis virus is enhanced by expression of the fusion cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase suicide gene. *Cancer Research*, 63(23), 8366–8376.
126. Obuchi, M., Fernandez, M., & Barber, G. N. (2003). Development of recombinant vesicular stomatitis viruses that exploit defects in host defense to augment specific oncolytic activity. *Journal of Virology*, 77(16), 8843–8856. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.16.8843-8856.2003>
127. Yamamoto, M., & Curiel, D. T. (2010). Current issues and future directions of oncolytic adenoviruses. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(2), 243–250. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.266>
128. Liikanen, I., Tähtinen, S., Guse, K., Gutmann, T., Savola, P., Oksanen, M., Kanerva, A., & Hemminki, A. (2016). Oncolytic Adenovirus Expressing Monoclonal Antibody Trastuzumab for Treatment of HER2-Positive Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(9), 2259–2269. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0819>
129. Bergman, I., Whitaker-Dowling, P., Gao, Y., Griffin, J. A., & Watkins, S. C. (2003). Vesicular stomatitis virus expressing a chimeric Sindbis glycoprotein containing an Fc antibody binding domain targets to Her2/neu overexpressing breast cancer cells. *Virology*, 316(2), 337–347. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.07.010>
130. Niavarani, S.-R., Lawson, C., Boudaud, M., Simard, C., & Tai, L.-H. (2020). Oncolytic vesicular stomatitis virus-based cellular vaccine improves triple-negative breast cancer outcome by enhancing natural killer and CD8+ T-cell

- functionality. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 8(1), e000465.
<https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000465>
131. Niavarani, S. R., Lawson, C., & Tai, L.-H. (2019). Treatment of Metastatic Disease through Natural Killer Cell Modulation by Infected Cell Vaccines. *Viruses*, 11(5), 434. <https://doi.org/10.3390/v11050434>
132. Diallo, J.-S., Le Boeuf, F., Lai, F., Cox, J., Vaha-Koskela, M., Abdelbary, H., MacTavish, H., Waite, K., Falls, T., Wang, J., Brown, R., Blanchard, J. E., Brown, E. D., Kirn, D. H., Hiscott, J., Atkins, H., Lichty, B. D., & Bell, J. C. (2010). A high-throughput pharmacoviral approach identifies novel oncolytic virus sensitizers. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(6), 1123–1129. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.67>
133. Bourgeois-Daigneault, M.-C., St-Germain, L. E., Roy, D. G., Pelin, A., Aitken, A. S., Arulanandam, R., Falls, T., Garcia, V., Diallo, J.-S., & Bell, J. C. (2016). Combination of Paclitaxel and MG1 oncolytic virus as a successful strategy for breast cancer treatment. *Breast Cancer Research*, 18(1), 83. <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0744-y>
134. Soliman, H., Hogue, D., Han, H., Mooney, B., Costa, R., Lee, M. C., Niell, B., Williams, A., Chau, A., Falcon, S., Khakpour, N., Weinfurter, R. J., Hoover, S., Kiluk, J., Rosa, M., Khong, H., & Czerniecki, B. (2021). A Phase I Trial of Talimogene Laherparepvec in Combination with Neoadjuvant Chemotherapy for the Treatment of Nonmetastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 27(4), 1012–1018. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-3105>
135. Ebrahimi, S., Ghorbani, E., Khazaei, M., Avan, A., Ryzhikov, M., Azadmanesh, K., & Hassanian, S. M. (2017). Interferon-Mediated Tumor Resistance to Oncolytic Virotherapy. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(8), 1994–1999. <https://doi.org/10.1002/jcb.25917>
136. Bhatt, D. K., Chammas, R., & Daemen, T. (2021). Resistance Mechanisms Influencing Oncolytic Virotherapy, a Systematic Analysis. *Vaccines*, 9(10), 1166. <https://doi.org/10.3390/vaccines9101166>
137. Huff, A. L., Wongthida, P., Kottke, T., Thompson, J. M., Driscoll, C. B., Schuelke, M., Shim, K. G., Harris, R. S., Molan, A., Pulido, J. S., Selby, P. J., Harrington, K. J., Melcher, A., Evgin, L., & Vile, R. G. (2018). APOBEC3 Mediates Resistance to Oncolytic Viral Therapy. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 11, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2018.08.003>

138. Kaufman, H. L., Kohlhapp, F. J., & Zloza, A. (2015). Oncolytic viruses: A new class of immunotherapy drugs. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 14(9), 642–662. <https://doi.org/10.1038/nrd4663>
139. Buijs, P. R., Verhagen, J. H., van Eijck, C. H., & van den Hoogen, B. G. (2015). Oncolytic viruses: From bench to bedside with a focus on safety. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 11(7), 1573–1584. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1037058>
140. Roberts, A., Buonocore, L., Price, R., Forman, J., & Rose, J. K. (1999). Attenuated vesicular stomatitis viruses as vaccine vectors. *Journal of Virology*, 73(5), 3723–3732. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.5.3723-3732.1999>
141. Chaurasiya, S., & Fong, Y. (2021). Viroimmunotherapy for breast cancer: Promises, problems and future directions. *Cancer Gene Therapy*, 28(7–8), 757–768. <https://doi.org/10.1038/s41417-020-00265-6>
142. Russell, S. J., Peng, K.-W., & Bell, J. C. (2012). Oncolytic virotherapy. *Nature Biotechnology*, 30(7), 658–670. <https://doi.org/10.1038/nbt.2287>
143. Martinez-Quintanilla, J., Seah, I., Chua, M., & Shah, K. (2019). Oncolytic viruses: Overcoming translational challenges. *The Journal of Clinical Investigation*, 129(4), 1407–1418. <https://doi.org/10.1172/JCI122287>
144. Evgin, L., & Vile, R. G. (2021). Parking CAR T Cells in Tumours: Oncolytic Viruses as Valets or Vandals? *Cancers*, 13(5), 1106. <https://doi.org/10.3390/cancers13051106>
145. Purohit, A., Newman, S. P., & Reed, M. J. (2002). The role of cytokines in regulating estrogen synthesis: Implications for the etiology of breast cancer. *Breast Cancer Research: BCR*, 4(2), 65–69. <https://doi.org/10.1186/bcr425>
146. Nilsson, S., & Gustafsson, J.-Å. (2010). Estrogen Receptors: Their Actions and Functional Roles in Health and Disease. In C. M. Bunce & M. J. Campbell (Eds.), *Nuclear Receptors* (pp. 91–141). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3303-1_5
147. Brzozowski, A. M., Pike, A. C., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engström, O., Ohman, L., Greene, G. L., Gustafsson, J. A., & Carlquist, M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, 389(6652), 753–758. <https://doi.org/10.1038/39645>
148. Wang, X., Simpson, E. R., & Brown, K. A. (2015). Aromatase overexpression in dysfunctional adipose tissue links obesity to postmenopausal

- breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 153, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.07.008>
149. Pike, A. C. W., Brzozowski, A. M., Walton, J., Hubbard, R. E., Bonn, T., Gustafsson, J.-Å., & Carlquist, M. (2000). Structural aspects of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Biochemical Society Transactions*, 28(4), 396–400. <https://doi.org/10.1042/bst0280396>
150. Zhu, B. T., Han, G.-Z., Shim, J.-Y., Wen, Y., & Jiang, X.-R. (2006). Quantitative Structure-Activity Relationship of Various Endogenous Estrogen Metabolites for Human Estrogen Receptor α and β Subtypes: Insights into the Structural Determinants Favoring a Differential Subtype Binding. *Endocrinology*, 147(9), 4132–4150. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0113>
151. Delaunay, F., Pettersson, K., Tujague, M., & Gustafsson, J. A. (2000). Functional differences between the amino-terminal domains of estrogen receptors alpha and beta. *Molecular Pharmacology*, 58(3), 584–590. <https://doi.org/10.1124/mol.58.3.584>
152. Couse, J. F., Lindzey, J., Grandien, K., Gustafsson, J. A., & Korach, K. S. (1997). Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology*, 138(11), 4613–4621. <https://doi.org/10.1210/endo.138.11.5496>
153. Cui, J., Shen, Y., & Li, R. (2013). Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: From periphery to brain. *Trends in Molecular Medicine*, 19(3), 197–209. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.12.007>
154. Xu, S., Yu, S., Dong, D., & Lee, L. T. O. (2019). G Protein-Coupled Estrogen Receptor: A Potential Therapeutic Target in Cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 725. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00725>
155. Ye, S., Xu, Y., Wang, L., Zhou, K., He, J., Lu, J., Huang, Q., Sun, P., & Wang, T. (2020). Estrogen-Related Receptor α (ERR α) and G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) Synergistically Indicate Poor Prognosis in Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *OncoTargets and Therapy*, 13, 8887–8899. <https://doi.org/10.2147/OTT.S265372>
156. Xu, Z., Liu, J., Gu, L., Ma, X., Huang, B., & Pan, X. (2016). Research progress on the reproductive and non-reproductive endocrine tumors by

- estrogen-related receptors. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 158, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.01.008>
157. Tam, I. S., & Giguère, V. (2016). There and back again: The journey of the estrogen-related receptors in the cancer realm. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 157, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.06.009>
158. Li, Y., Birnbaumer, L., & Teng, C. T. (2010). Regulation of ERRalpha gene expression by estrogen receptor agonists and antagonists in SKBR3 breast cancer cells: Differential molecular mechanisms mediated by g protein-coupled receptor GPR30/GPER-1. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 24(5), 969–980. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0148>
159. Cooper TK, Smith OM. (2010). Gynecologic Disorders in the Elderly. *Brocklehurst's Textbook of Geriatric Medicine and Gerontology (Seventh Edition)*, W.B. Saunders. Howard M. Fillit, Kenneth Rockwood, Kenneth Woodhouse. 716-725
160. Hornstein T, Schwerin JL (1 January 2012). *Biology of Women*. Cengage Learning. pp. 369–.
161. Kuhl, H. (2005). Pharmacology of estrogens and progestogens: Influence of different routes of administration. *Climacteric: The Journal of the International Menopause Society*, 8 Suppl 1, 3–63. <https://doi.org/10.1080/13697130500148875>
162. Chervenak, J. (2009). Bioidentical hormones for maturing women. *Maturitas*, 64(2), 86–89. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2009.08.002>
163. Strauss JF, Barbieri RL (13 September 2013). *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology*. Elsevier Health Sciences. pp. 256–.
164. H. Maurice Goodman (14 March 2003). *Basic Medical Endocrinology*. Academic Press. pp. 436–.
165. Rueda, C., Osorio, A. M., Avellaneda, A. C., Pinzón, C. E., & Restrepo, O. I. (2017). The efficacy and safety of estriol to treat vulvovaginal atrophy in postmenopausal women: A systematic literature review. *Climacteric: The Journal of the International Menopause Society*, 20(4), 321–330. <https://doi.org/10.1080/13697137.2017.1329291>

166. Ali, E. S., Mangold, C., & Peiris, A. N. (2017). Estriol: Emerging clinical benefits. *Menopause*, 24(9), 1081–1085.
<https://doi.org/10.1097/GME.0000000000000855>
167. Voskuhl, R. R., Wang, H., Wu, T. C. J., Sicotte, N. L., Nakamura, K., Kurth, F., Itoh, N., Bardens, J., Bernard, J. T., Corboy, J. R., Cross, A. H., Dhib-Jalbut, S., Ford, C. C., Frohman, E. M., Giesser, B., Jacobs, D., Kasper, L. H., Lynch, S., Parry, G., ... Elashoff, R. (2016). Estriol combined with glatiramer acetate for women with relapsing-remitting multiple sclerosis: A randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet. Neurology*, 15(1), 35–46.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00322-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00322-1)
168. A. Labhart (6 December 2012). *Clinical Endocrinology: Theory and Practice*. Springer Science & Business Media. pp. 548–.
169. Escande, A., Pillon, A., Servant, N., Cravedi, J.-P., Larrea, F., Muhn, P., Nicolas, J.-C., Cavallès, V., & Balaguer, P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochemical Pharmacology*, 71(10), 1459–1469.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.02.002>
170. Prossnitz, E. R., & Arterburn, J. B. (2015). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVII. G Protein–Coupled Estrogen Receptor and Its Pharmacologic Modulators. *Pharmacological Reviews*, 67(3), 505–540.
<https://doi.org/10.1124/pr.114.009712>
171. Girgert, R., Emons, G., & Gründker, C. (2014). Inhibition of GPR30 by estriol prevents growth stimulation of triple-negative breast cancer cells by 17 β -estradiol. *BMC Cancer*, 14(1), 935. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-935>
172. Holinka, C. F., Diczfalusy, E., & Coelingh Bennink, H. J. T. (2008). Estetrol: A unique steroid in human pregnancy. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 110(1–2), 138–143.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.03.027>
173. Gérard, C., Blacher, S., Communal, L., Courtin, A., Tskitishvili, E., Mestdagt, M., Munaut, C., Noel, A., Gompel, A., Péqueux, C., & Foidart, J. M. (2015). Estetrol is a weak estrogen antagonizing estradiol-dependent mammary gland proliferation. *The Journal of Endocrinology*, 224(1), 85–95.
<https://doi.org/10.1530/JOE-14-0549>

174. Gérard C, Jost M, Oligschläger Y, Foidart JM (2021). "Estetrol, a natural estrogen with selective tissue activity (NEST). Poster Abstract". *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. **155**: 127–532.
175. Coelingh Bennink, H. J. T., Skouby, S., Bouchard, P., & Holinka, C. F. (2008). Ovulation inhibition by estetrol in an in vivo model. *Contraception*, *77*(3), 186–190. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2007.11.014>
176. Pluchino, N., Santoro, A. N., Casarosa, E., Giannini, A., Genazzani, A., Russo, M., Russo, N., Petignat, P., & Genazzani, A. R. (2014). Effect of estetrol administration on brain and serum allopregnanolone in intact and ovariectomized rats. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *143*, 285–290. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.04.011>
177. Coelingh Bennink, H. J. T., Heegaard, A.-M., Visser, M., Holinka, C. F., & Christiansen, C. (2008). Oral bioavailability and bone-sparing effects of estetrol in an osteoporosis model. *Climacteric: The Journal of the International Menopause Society*, *11 Suppl 1*, 2–14. <https://doi.org/10.1080/13697130701798692>
178. Foidart, J. M., Gaspard, U., Pequeux, C., Jost, M., Gordenne, V., Tskitishvili, E., Gallez, A., Valera, M. C., Gourdy, P., Fontaine, C., Henrion, D., Genazzani, A. R., Lenfant, F., & Arnal, J. F. (2019). Unique Vascular Benefits of Estetrol, a Native Fetal Estrogen with Specific Actions in Tissues (NEST). In R. D. Brinton, A. R. Genazzani, T. Simoncini, & J. C. Stevenson (Eds.), *Sex Steroids' Effects on Brain, Heart and Vessels* (pp. 169–195). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11355-1_12
179. Klipping, C., Duijkers, I., Mawet, M., Maillard, C., Bastidas, A., Jost, M., & Foidart, J.-M. (2021). Endocrine and metabolic effects of an oral contraceptive containing estetrol and drospirenone. *Contraception*, *103*(4), 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2021.01.001>
180. Estetrol/drospirenone (Nextstellis)—A new combination oral contraceptive. (2021). *The Medical Letter on Drugs and Therapeutics*, *63*(1627), 101–102.
181. Schmidt, M., Lenhard, H., Hoenig, A., Zimmerman, Y., Krijgh, J., Jansen, M., & Coelingh Bennink, H. J. T. (2021). Tumor suppression, dose-limiting toxicity and wellbeing with the fetal estrogen estetrol in patients with advanced breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *147*(6), 1833–1842. <https://doi.org/10.1007/s00432-020-03472-8>

182. Coelingh Bennink, H. J. T., van Moorselaar, J. A., Crawford, E. D., Roos, E. P. M., Somford, D. M., Roeleveld, T. A., de Haan, T. D., van Melick, H. H. E., Reisman, Y., Zimmerman, Y., van Osta, G., Krijgh, J., Shore, N. D., Saad, F., Schally, A. V., & Debruyne, F. M. J. (2021). Estetrol Cotreatment of Androgen Deprivation Therapy in Infiltrating or Metastatic, Castration-sensitive Prostate Cancer: A Randomized, Double-blind, Phase II Trial (PCombi). *European Urology Open Science*, 28, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.euros.2021.04.005>
183. Ennour-Idrissi, K., Maunsell, E., & Diorio, C. (2015). Effect of physical activity on sex hormones in women: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Breast Cancer Research: BCR*, 17(1), 139. <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0647-3>
184. Peretz, J., Pekosz, A., Lane, A. P., & Klein, S. L. (2016). Estrogenic compounds reduce influenza A virus replication in primary human nasal epithelial cells derived from female, but not male, donors. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 310(5), L415-425. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00398.2015>
185. Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., Jacobsen, A., Byrne, C. J., Heuer, M. L., Larsson, E., Antipin, Y., Reva, B., Goldberg, A. P., Sander, C., & Schultz, N. (2012). The cBio cancer genomics portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discovery*, 2(5), 401–404. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095>
186. Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S. O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., Cerami, E., Sander, C., & Schultz, N. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science Signaling*, 6(269), p1. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004088>
187. Hamilton, D. H., Griner, L. M., Keller, J. M., Hu, X., Southall, N., Marugan, J., David, J. M., Ferrer, M., & Palena, C. (2016). Targeting Estrogen Receptor Signaling with Fulvestrant Enhances Immune and Chemotherapy-Mediated Cytotoxicity of Human Lung Cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 22(24), 6204–6216. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-3059>
188. Dunnwald, L. K., Rossing, M. A., & Li, C. I. (2007). Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: A prospective cohort of breast

- cancer patients. *Breast Cancer Research: BCR*, 9(1), R6.
<https://doi.org/10.1186/bcr1639>
189. Li, L., Wang, Q., Lv, X., Sha, L., Qin, H., Wang, L., & Li, L. (2015). Expression and Localization of Estrogen Receptor in Human Breast Cancer and Its Clinical Significance. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 71(1), 63–68.
<https://doi.org/10.1007/s12013-014-0163-6>
190. Shen, Z., Luo, H., Li, S., Sheng, B., Zhao, M., Zhu, H., & Zhu, X. (2017). Correlation between estrogen receptor expression and prognosis in epithelial ovarian cancer: A meta-analysis. *Oncotarget*, 8(37), 62400–62413.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.18253>
191. Leung, Y.-K., Lee, M.-T., Lam, H.-M., Tarapore, P., & Ho, S.-M. (2012). Estrogen receptor-beta and breast cancer: Translating biology into clinical practice. *Steroids*, 77(7), 727–737. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.03.008>
192. Leygue, E., & Murphy, L. C. (2013). A bi-faceted role of estrogen receptor β in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 20(3), R127-139.
<https://doi.org/10.1530/ERC-12-0389>
193. Miki, Y., Suzuki, T., & Sasano, H. (2007). Controversies of aromatase localization in human breast cancer—Stromal versus parenchymal cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 106(1–5), 97–101.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2007.05.007>
194. Kovats, S. (2015). Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cellular Immunology*, 294(2), 63–69.
<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.01.018>
195. Dannenfelser, R., Nome, M., Tahiri, A., Ursini-Siegel, J., Vollan, H. K. M., Haakensen, V. D., Helland, Å., Naume, B., Caldas, C., Børresen-Dale, A.-L., Kristensen, V. N., & Troyanskaya, O. G. (2017). Data-driven analysis of immune infiltrate in a large cohort of breast cancer and its association with disease progression, ER activity, and genomic complexity. *Oncotarget*, 8(34), 57121–57133. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19078>
196. Jiang, X., Orr, B. A., Kranz, D. M., & Shapiro, D. J. (2006). Estrogen Induction of the Granzyme B Inhibitor, Proteinase Inhibitor 9, Protects Cells against Apoptosis Mediated by Cytotoxic T Lymphocytes and Natural Killer Cells. *Endocrinology*, 147(3), 1419–1426. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0996>

197. Tai, P., Wang, J., Jin, H., Song, X., Yan, J., Kang, Y., Zhao, L., An, X., Du, X., Chen, X., Wang, S., Xia, G., & Wang, B. (2008). Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen. *Journal of Cellular Physiology*, 214(2), 456–464. <https://doi.org/10.1002/jcp.21221>
198. Péqueux, C., Raymond-Letron, I., Blacher, S., Boudou, F., Adlanmerini, M., Fouque, M.-J., Rochaix, P., Noël, A., Foidart, J.-M., Krust, A., Chambon, P., Brouchet, L., Arnal, J.-F., & Lenfant, F. (2012). Stromal estrogen receptor- α promotes tumor growth by normalizing an increased angiogenesis. *Cancer Research*, 72(12), 3010–3019. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3768>
199. Knowler, K. C., Chand, A. L., Eriksson, N., Takagi, K., Miki, Y., Sasano, H., Visvader, J. E., Lindeman, G. J., Funder, J. W., Fuller, P. J., Simpson, E. R., Tilley, W. D., Leedman, P. J., Graham, J. D., Muscat, G. E. O., Clarke, C. L., & Clyne, C. D. (2013). Distinct nuclear receptor expression in stroma adjacent to breast tumors. *Breast Cancer Research and Treatment*, 142(1), 211–223. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2716-6>
200. Ciucci, A., Zannoni, G. F., Buttarelli, M., Lisi, L., Travaglia, D., Martinelli, E., Scambia, G., & Gallo, D. (2016). Multiple direct and indirect mechanisms drive estrogen-induced tumor growth in high grade serous ovarian cancers. *Oncotarget*, 7(7), 8155–8171. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6943>
201. Svoronos, N., Perales-Puchalt, A., Allegrezza, M. J., Rutkowski, M. R., Payne, K. K., Tesone, A. J., Nguyen, J. M., Curiel, T. J., Cadungog, M. G., Singhal, S., Eruslanov, E. B., Zhang, P., Tchou, J., Zhang, R., & Conejo-Garcia, J. R. (2017). Tumor Cell-Independent Estrogen Signaling Drives Disease Progression through Mobilization of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Discovery*, 7(1), 72–85. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0502>
202. Somasundaram, A., Rothenberger, N. J., & Stabile, L. P. (2020). The Impact of Estrogen in the Tumor Microenvironment. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1277, 33–52. https://doi.org/10.1007/978-3-030-50224-9_2
203. Huang, H., Zhou, J., Chen, H., Li, J., Zhang, C., Jiang, X., & Ni, C. (2021). The immunomodulatory effects of endocrine therapy in breast cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 40(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01788-4>

204. Le Naour, A., Rossary, A., & Vasson, M.-P. (2020). EO771, is it a well-characterized cell line for mouse mammary cancer model? Limit and uncertainty. *Cancer Medicine*, 9(21), 8074–8085. <https://doi.org/10.1002/cam4.3295>
205. Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R., & Li, Z.-W. (2002). NF-kappaB in cancer: From innocent bystander to major culprit. *Nature Reviews. Cancer*, 2(4), 301–310. <https://doi.org/10.1038/nrc780>
206. Deng, L., Zeng, Q., Wang, M., Cheng, A., Jia, R., Chen, S., Zhu, D., Liu, M., Yang, Q., Wu, Y., Zhao, X., Zhang, S., Liu, Y., Yu, Y., Zhang, L., & Chen, X. (2018). Suppression of NF-κB Activity: A Viral Immune Evasion Mechanism. *Viruses*, 10(8), 409. <https://doi.org/10.3390/v10080409>
207. Nabel, G., & Baltimore, D. (1987). An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature*, 326(6114), 711–713. <https://doi.org/10.1038/326711a0>
208. Rong, B. L., Libermann, T. A., Kogawa, K., Ghosh, S., Cao, L. X., Pavan-Langston, D., & Dunkel, E. C. (1992). HSV-1-inducible proteins bind to NF-kappa B-like sites in the HSV-1 genome. *Virology*, 189(2), 750–756. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90599-k](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90599-k)
209. Xing, D., Oparil, S., Yu, H., Gong, K., Feng, W., Black, J., Chen, Y.-F., & Nozell, S. (2012). Estrogen modulates NFκB signaling by enhancing IκBα levels and blocking p65 binding at the promoters of inflammatory genes via estrogen receptor-β. *PloS One*, 7(6), e36890. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036890>
210. Murphy, A. J., Guyre, P. M., & Pioli, P. A. (2010). Estradiol suppresses NF-kappa B activation through coordinated regulation of let-7a and miR-125b in primary human macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 184(9), 5029–5037. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903463>
211. Karin, M., & Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF-[kappa]B activity. *Annual Review of Immunology*, 18, 621–663. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.621>
212. Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*, 132(3), 344–362. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.020>
213. Giuliani, C., Bucci, I., & Napolitano, G. (2018). The Role of the Transcription Factor Nuclear Factor-kappa B in Thyroid Autoimmunity and

- Cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 471.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00471>
214. Sun, S.-C. (2011). Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Research*, 21(1), 71–85. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.177>
215. Xiao, G., Harhaj, E. W., & Sun, S. C. (2001). NF- κ B-inducing kinase regulates the processing of NF- κ B2 p100. *Molecular Cell*, 7(2), 401–409. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00187-3](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00187-3)
216. Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F. R., Krähn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S. C., & Karin, M. (2001). Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5534), 1495–1499. <https://doi.org/10.1126/science.1062677>
217. Wang, W., Nag, S. A., & Zhang, R. (2015). Targeting the NF κ B signaling pathways for breast cancer prevention and therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 22(2), 264–289. <https://doi.org/10.2174/0929867321666141106124315>
218. Peddi, P. F., Ellis, M. J., & Ma, C. (2012). Molecular basis of triple negative breast cancer and implications for therapy. *International Journal of Breast Cancer*, 2012, 217185. <https://doi.org/10.1155/2012/217185>
219. Selman, M., Ou, P., Rousso, C., Bergeron, A., Krishnan, R., Pikor, L., Chen, A., Keller, B. A., Ilkow, C., Bell, J. C., & Diallo, J.-S. (2018). Dimethyl fumarate potentiates oncolytic virotherapy through NF- κ B inhibition. *Science Translational Medicine*, 10(425), eaao1613. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aao1613>
220. Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S.-C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2, 17023-. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
221. Harris, J., Oliére, S., Sharma, S., Sun, Q., Lin, R., Hiscott, J., & Grandvaux, N. (2006). Nuclear accumulation of cRel following C-terminal phosphorylation by TBK1/IKK epsilon. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177(4), 2527–2535. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.4.2527>
222. Bastin, D., Aitken, A. S., Pelin, A., Pikor, L. A., Crupi, M. J. F., Huh, M. S., Bourgeois-Daigneault, M.-C., Bell, J. C., & Ilkow, C. S. (2018). Enhanced susceptibility of cancer cells to oncolytic rhabdo-virotherapy by expression of

- Nodamura virus protein B2 as a suppressor of RNA interference. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 6(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0366-2>
223. Langlois, R. A., Shapiro, J. S., Pham, A. M., & tenOever, B. R. (2012). In vivo delivery of cytoplasmic RNA virus-derived miRNAs. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 20(2), 367–375. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.244>
224. Varble, A., Benitez, A. A., Schmid, S., Sachs, D., Shim, J. V., Rodriguez-Barrueco, R., Panis, M., Crumiller, M., Silva, J. M., Sachidanandam, R., & tenOever, B. R. (2013). An in vivo RNAi screening approach to identify host determinants of virus replication. *Cell Host & Microbe*, 14(3), 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.08.007>
225. Iacopetta, D., Rechoum, Y., & Fuqua, S. A. (2012). The Role of Androgen Receptor in Breast Cancer. *Drug Discovery Today. Disease Mechanisms*, 9(1–2), e19–e27. <https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2012.11.003>
226. Lai, J.-J., Lai, K.-P., Zeng, W., Chuang, K.-H., Altuwaijri, S., & Chang, C. (2012). Androgen Receptor Influences on Body Defense System via Modulation of Innate and Adaptive Immune Systems. *The American Journal of Pathology*, 181(5), 1504–1512. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.07.008>
227. Rahman, M. M., & McFadden, G. (2021). Oncolytic Viruses: Newest Frontier for Cancer Immunotherapy. *Cancers*, 13(21), 5452. <https://doi.org/10.3390/cancers13215452>
228. Litton, J. K., Burstein, H. J., & Turner, N. C. (2019). Molecular Testing in Breast Cancer. *American Society of Clinical Oncology Educational Book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting*, 39, e1–e7. https://doi.org/10.1200/EDBK_237715
229. Schwaiger, T. (2020, February). *An Updated Review on Hormone Replacement Therapy For Menopausal Women*. Natural Medicine Journal. Available from: <https://www.naturalmedicinejournal.com/journal/updated-review-hormone-replacement-therapy-menopausal-women>
230. ViraTherapeutics GmbH. (n.d.). *Oncolytic Viruses*. <https://www.viratherapeutics.com/oncolytic-viruses.html>

231. Xu, X., & Veenstra, T. D. (2012). Concentration of endogenous estrogens and estrogen metabolites in the NCI-60 human tumor cell lines. *Genome Medicine*, 4(4), 31. <https://doi.org/10.1186/gm330>