



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 4390](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints/ID/4390)

To cite this version :

YAOUALA, Myriam. *Utilisation des vecteurs viraux dans l'immunothérapie antitumorale*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Toulouse 3, 2010, 227 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

UTILISATION DES VECTEURS VIRAUX DANS L'IMMUNOTHERAPIE ANTITUMORALE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2010
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

YOUALA Myriam, Samira
Née, le 22 février 1983 à Maisons-Laffitte(78)

Directeur de thèse : M. le Docteur Stéphane BERTAGNOLI

JURY

PRESIDENT :

M. Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :

M. Stéphane BERTAGNOLI

Mme Séverine BOULLIER

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

A notre président de thèse,

A Monsieur le Professeur Christophe PASQUIER

Professeur des Universités de Toulouse

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Hommages respectueux.

A notre jury de thèse,

A Monsieur le Docteur Stéphane BERTAGNOLI

Maitre de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie infectieuse

Qui nous a guidés tout au long de ce travail.

Pour sa disponibilité et ses conseils.

Sincère reconnaissance.

A Madame le Docteur Séverine BOULLIER

Maitre de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Immunologie générale et médicale

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse.

Sincères remerciements.

A toute ma famille,

A ma Mamie et mon Papy,

Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez fait pour moi... Merci de m'avoir toujours soutenue dans la réalisation de mes rêves et d'avoir toujours été à mes côtés. Je vous aime.

A ma petite maman chérie,

Merci d'avoir toujours tout fait pour nous trois. Je t'aime.

A Patrice, mon père d'adoption,

Merci de m'accompagner et m'encourager depuis toutes ces années. Merci de rendre maman heureuse. Je t'aime.

A Angélique, ma grande sœur,

Grandir à tes côtés fut un privilège et un plaisir ; nous avons tout partagé : chambre, vacances, amoureux et amis, soirées (chance d'avoir une grande sœur), vêtements (enfin c'est surtout toi qui prêtais), maquillage (idem), douche sous les arbres... Merci d'être une super sœur. Je t'aime et admire ta force.

A Térence, mon petit frère chéri,

Merci d'avoir joué ton rôle de petit frère dans tous les sens du terme. Je t'aime.

A David,

Merci d'aimer ma sœur et de prendre soin d'elle.

A Christophe, mon amour, mon ami, mon équilibre.

A tous mes amis vétérinaires ou presque,

A Estelle et Rémi,

Merci de m'avoir adoptée. Estelle merci pour ton amitié précieuse et fidèle, et que les statuettes fonctionnent bordel !

A Céline P,

A tous ces moments délirants passés ensemble, à notre imagination débordante lorsque nous sommes réunies, à nos éternelles discussions de filles. Merci à toi et **Julien C** pour m'avoir accueillie sur Adishatz.

A Clémouille et Lolo,

Merci, à tous les deux pour votre soutien. Merci de m'avoir fait découvrir l'escalade, Teddy Bear, le Boggle, le sommeil sous ronronnement permanent et le Hamburger au morbier. Clémouille, merci pour ton hyperactivité et ta bonne humeur permanente.

A Delphine,

Mon amie, ma collègue, ma coloc. Parce que sans toi, je n'aurais pas tenu tout ce temps à Oradour. Puisse-tu réaliser ton aventure australienne. Et sinon, viens travailler avec moi !

A Laura,

Parce que je ne sais toujours pas comment j'ai pu me passer de toi pendant 5 ans !!!

Aux P'tit LU, la meilleure collocation qui soit,

Léni, parce que vivre avec toi et te faire à manger fut un plaisir ; **Mikaël**, parce que tu es mon meilleur ami ; **Baptiste**, parce que tu es le seul à pouvoir tondre la pelouse en un après midi entier. Vivre avec vous trois fut une expérience très riche et très drôle.

A Bubble,

Mon autre meilleur ami : merci, tu as toujours été là au moment où j'en avais le plus besoin. Comme quoi sur un malentendu, il peut se passer de bonnes choses...

A Billy,

Ma copine que j'adore qui est toujours de bonne humeur (sauf le 1er trimestre de sa grossesse).

A Caro B et Mathieu L,

Mes parents castrais, merci pour tout et mon cadeau d'anniversaire 2009...

A Fanny et Ronsard,

Parce que Fanny, tu ne seras pas l'oubliée de ma thèse... Et que j'aimerais vous voir plus souvent.

A Annou,

Pour tous les moments passés ensemble à rigoler, travailler, cuisiner, languedeputer, ragoter, magasiner, skier...

A Nannou,

A nos instants thé, nos instants biotonic et longues conversations existentielles.

A Brice,

A nos colles en cachette, aux craquages du « couloir de la mort », à notre amitié.

A Julie R, la fille la plus entière que je connaisse.

A Milou et Walou,

Pour m'avoir initiée à la montagne un week-end de 9 mai, 1m de neige dans la nuit où j'ai compris que le sac de couchage de mon arrière grand-mère n'était pas hyper technique...

Aux St Louisards, parce que nous avons été liés dans la difficulté.

Camille : ma petite Bizuthe, **Mathieu P, Jeanne, Pascal B, Guillaume Lemaire, Mando, Pascale S, Pauline, Yann, Gus, Laurence, Poussin, Marion, Mag**

A tous mes copromos avec qui j'ai passé d'excellents moments à différentes périodes de ces années d'étude (en vrac),

Aude, Maïa, Justine, Bentabinch, Mado, Majida, Taquet, Alex Langford, JM, Guillaume Leroy, Marie F, Cariou, Alex P, Vivien, Cyrielle, Bousse, Juliette, Stéph D, Bep, Babar, Alice, Python, Gazou, MLB, Nath, Lucile, Psi, Vanessa, Virginia. Foufoune, Isa, Justine.

Aux vieux (en vrac)

Pascal S : merci pour tous ces moments passés ensemble.

Hutch, mon petit Seb : tu me manques.

Baz, Iban, Adrien, Douze, Bob, Alex K, Guigui L, Annie, JB, Mickey F, Yannou, Deb, Pillot, Romu, Ti Nico, Elodie B, Caro B, Cathycat, Laure, Lionel

Hélène P, Julie P, Marie M, pour nos soirées de filles.

Aux jeunes (en vrac)

Pinpin, Laura, Christelle, Golden B, Jérôme, Krokette, Marine.

A mes amis de longue date (ou pas)

Perrine, mon amie à distance : pourvu que nous parvenions à nous appeler une fois dans l'année et le lien perdure.

Mon Elise : quelle rencontre stupéfiante !

Céline D (Lelan-Leluyer), mon amie bientôt maman, que de nostalgie quand je te vois.

Pitou, Julien C, Nico

Les amis et/ou collègues castrais et alentours : **Petra, Thibault, Michel G, Véro, Michel P, Jean-Marc, M. Gipoulou, PG, Olivier, Pierre, Vince, Milla, Isa, Julio, Mimoune.**

Graz et Steph, mes anciens voisins préférés.

A Johann, parce que jouer l'escort-girl pour toi fut une expérience très rigolote.

A ceux que j'oublie, mille excuses.

Table des matières

table des illustrations.....	6
INTRODUCTION.....	7
PREMIÈRE PARTIE : VECTEURS VIRAUX ET IMMUNOTHÉRAPIE ANTITUMORALE : OBJECTIFS, PRINCIPES, STRATÉGIES ET OUTILS.....	9
A.OBJECTIFS DE L'IMMUNOTHÉRAPIE ANTITUMORALE.....	9
<i>I. Définition de l'immunothérapie.....</i>	<i>9</i>
<i>II. Cancer : généralités, histoire et causes.....</i>	<i>10</i>
a.Cancer : généralités	10
b.Cancer : historique.....	11
c.Cancer : causes majeures.....	13
<i>III.Objectif de l'immunothérapie antitumorale.....</i>	<i>16</i>
B.PRINCIPES DE L'IMMUNOTHÉRAPIE ANTITUMORALE.....	17
<i>I.Rappel sur l'oncogénèse.....</i>	<i>17</i>
a.Les cellules tumorales ont un potentiel de réplication illimitée.....	18
b.Autonomie des cellules tumorales vis à vis des signaux de croissance.....	20
<i>i.Sur-expression de récepteurs cellulaires de surface.....</i>	<i>21</i>
<i>ii.Sélection des récepteurs extracellulaires.....</i>	<i>21</i>
<i>iii.Libération de signaux mitogéniques.....</i>	<i>22</i>
<i>iv.Sur-expression de facteurs de transcription.....</i>	<i>22</i>
c.Insensibilité aux inhibiteurs de signaux de croissance.....	23
d.Capacité à stimuler l'angiogenèse.....	25
e.Invasion des tissus et métastases.....	26
<i>i.Altération des fonctions de contact : E-cadhérine.....</i>	<i>27</i>
<i>ii.Altérations des fonctions de contact : CAM.....</i>	<i>27</i>
<i>iii.Altérations des fonctions de contact : intégrines</i>	<i>28</i>
<i>iv.Présence de métallo-protéases.....</i>	<i>28</i>
f.Échappement à l'apoptose.....	29
g.L'instabilité génétique.....	31
<i>II. Rappel sur l'immunité antitumorale.....</i>	<i>31</i>
a.Reconnaissance de la cellule tumorale par le système immunitaire.....	32
<i>i.Les antigènes spécifiques de tumeur.....</i>	<i>33</i>
<i>ii.Les antigènes associés aux tumeurs.....</i>	<i>34</i>
b.Réponse immunitaire antitumorale censée se développer.....	34
<i>i.Induction de la réponse immunitaire</i>	<i>34</i>
<i>ii.Lyse des cellules tumorales.....</i>	<i>36</i>
<i>III. Échappement des tumeurs à l'immunité.....</i>	<i>36</i>
a.Une réponse immunitaire antitumorale souvent inefficace.....	36
b.Induction d'une tolérance à l'égard des cellules tumorales.....	37
c.Les mécanismes d'échappement de la cellule tumorale.....	38
<i>i.La faible immunogénicité de la cellule tumorale.....</i>	<i>39</i>
<i>ii.La sécrétion locale de facteurs suppresseurs</i>	<i>39</i>
<i>iii.La présentation des antigènes par les cellules tumorales peut être déficiente.....</i>	<i>40</i>
<i>iv.Les molécules d'adhérences aux lymphocytes peuvent faire défaut chez la cellule tumorale</i>	

(LFA-3 ou ICAM-1)	40
v. Une adaptation aux défenses immunitaires.....	40
IV. Principe de l'immunothérapie.....	41
a. Immunothérapie passive.....	41
b. Immunothérapie active.....	42
C. STRATÉGIES ET OUTILS.....	43
I. Stratégies de l'immunothérapie dans la lutte antitumorale.....	43
a. Induction d'une réponse immunitaire spécifique.....	43
i. Transduction ex vivo de cellules dendritiques et immunothérapie anticancéreuse.....	44
ii. Transduction directe in vivo et immunothérapie anticancéreuse.....	44
b. Induction d'une modulation de la réponse immunitaire.....	45
c. Immunothérapie combinée à la virothérapie et thérapie monoclonale.....	45
i. Virothérapie oncolytique en association avec l'utilisation de vecteurs viraux.....	45
ii. Vecteurs viraux et thérapie monoclonale.....	45
II. Outils utilisés.....	46
a. Molécules utilisées.....	46
i. TAA ou antigènes tumoraux.....	46
ii. Les cytokines.....	46
iii. Molécules de costimulation.....	46
iv. Anticorps.....	47
b. Vecteurs viraux utilisés.....	47
DEUXIÈME PARTIE :	
VECTEURS VIRAUX ET IMMUNOTHÉRAPIE ANTITUMORALE : INDUCTION D'UNE RÉPONSE	
IMMUNITAIRE ANTITUMORALE EFFICACE	50
A. VECTEURS VIRAUX ET IMMUNOTHÉRAPIE ANTITUMORALE : INDUCTION D'UNE	
RÉPONSE IMMUNITAIRE SPÉCIFIQUE.....	50
I. Transduction de cellules dendritiques ex vivo : applications.....	50
a. Stratégie.....	50
b. Exemple : utilisation d'un adenovirus vecteur du gène ErbB-2/neu.....	51
i. Adénovirus : présentation, avantages et inconvénients de leur utilisation en tant que vecteur... ..	51
ii. Le gène de transfert ErbB-2/neu.....	55
iii. Transduction des cellules dendritiques ex vivo.....	56
iv. Résultats.....	57
c. Autres applications.....	62
II. Transduction de lymphocytes T ex vivo.....	63
a. Stratégie.....	63
b. Exemple : utilisation d'un rétrovirus pour transduire des lymphocytes T susceptibles	
d'induire une réponse contre un mélanome	65
i. Oncorétrovirus et Lentivirus : présentation, avantages et inconvénients de leur utilisation en tant	
que vecteur.....	65
ii. Le transgène.....	68
iii. Résultats.....	69
c. Autres applications	73
III. Injection directe systémique de vecteurs pour induire une réponse spécifique.....	73
a. Stratégie	73
b. Exemple : injection directe d'un vecteur lentiviral induisant une immunité antitumorale dans	
un modèle murin.....	74

c.Limites et perspectives.....	79
i.Déjouer le système immunitaire pour faciliter l'administration systémique.....	79
ii.Des vecteurs ciblant pour augmenter l'efficacité de l'administration systémique et la sécurité. .	80

IV.Exemple de l'utilisation du virus de la vaccine dans la lutte contre les cancers anogénitaux (ou l'utilisation de vecteur codant pour des TAA ayant pour origine un virus inducteur de tumeur)

.....	81
a.Les papillomavirus : des virus inducteurs de cancers.....	82
b.Virus de la vaccine et vaccination thérapeutique dans les cancers induits par les PVH... ..	83
i.Virus de la vaccine : présentation.....	83
ii.La réplication poxvirale	84
iii. Les poxvirus atténués recombinants.....	86
iv.Essai clinique : utilisation du virus de la vaccine comme vecteur des protéines E6 et E7.....	89
c.Bilan.....	92

B.VECTEURS VIRAUX ET IMMUNOTHÉRAPIE ANTITUMORALE : MODULATION DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE.....93

<i>I.Injection intratumorale de vecteurs viraux</i>	93
a.Stratégie.....	93
i. Vecteurs viraux et expression de cytokines.....	94
ii.Vecteurs viraux et expression de molécules de costimulation	98
b.Exemple : essai clinique de phase I/II utilisant un adenovirus porteur du transgène IL-2 chez des patients atteints de tumeurs solides et de mélanome.....	102
i.Présentation.....	102
ii.Résultats.....	103
<i>II.Transduction ex vivo de cellules tumorales autologues.....</i>	107
a.Stratégie.....	107
b.Exemple 1 : utilisation d'un virus déficient Herpès Simplex-2 vecteur pour les gènes IL-2, GM-CSF et B7-1 dans un modèle de carcinome épidermoïde.....	108
i.HSV : présentation, avantages et inconvénient de leur utilisation en tant que vecteur.....	108
ii.Les transgènes	111
iii.Résultats.....	112
c.Autres exemples : ostéosarcomes et lymphomes à cellules B.....	114
i.Ostéosarcomes.....	114
ii.Utilisation d'un vecteur dérivé du virus Epstein-Barr pour transduire des cellules B tumorales. .	114

**TROISIÈME PARTIE :
VECTEURS VIRAUX ET IMMUNOTHÉRAPIE ANTITUMORALE : COMBINAISON AVEC LA VIROTHÉRAPIE ET LA THÉRAPIE MONOCLONALE.....116**

A.VECTOROLOGIE ET VIROTHÉRAPIE DANS L'IMMUNOTHÉRAPIE ANTITUMORALE.....116

<i>I.Virothérapie oncolytique : présentation.....</i>	116
a.Virus oncolytique : définition.....	117
b.Différentes activités oncolytiques.....	118
i.Virus oncolytique : caractéristiques idéales.....	118
ii.Oncolyse viro-induite naturelle.....	120
iii.Induction d'une immunité antitumorale.....	121
iv.Augmentation de la spécificité d'autres thérapies.....	122
c.Spécificité antitumorale des virus oncolytiques.....	122
i.Entrée dans les cellules tumorales spécifiquement.....	123
ii.Réplication conditionnelle.....	124
<i>II.Virus oncolytiques et immunostimulation.....</i>	127
a.Stratégie.....	127

b.Exemple : utilisation d'un adénovirus à réplication conditionnelle porteur du gène mda-7/IL-24.....	128
i.Adenovirus oncolytiques.....	128
ii.Le transgène : mda-7/IL24.....	130
iii.Résultats.....	130
c.Bilan et perspective.....	137
III. <i>Virus oncolytiques et vaccination</i>	139
a.Stratégie	139
a.Exemple : utilisation du virus de la vaccine recombinant en tant que vaccin antitumoral	139
i.Virus de la vaccine : un virus oncolytique.....	139
ii.Le transgène.....	141
iii.Résultats.....	142
b.Bilan et perspectives.....	149

B.VECTOROLOGIE ET THÉRAPIE MONOCLONALE DANS L'IMMUNOTHÉRAPIE ANTITUMORALE.....150

I. <i>Thérapie monoclonale : présentation</i>	150
a.Anticorps monoclonaux : historique	150
b.Anticorps monoclonaux et tumeurs solides.....	154
c.La cible HER-2 et l'Acm trastuzumab.....	154
II. <i>Vecteurs viraux et thérapie monoclonale dans la lutte antitumorale</i>	157
a.Stratégie	157
b.Exemple : utilisation d'un adénovirus pour produire des Acm anti-HER-2.....	158
i.Objectif.....	158
ii.Résultats.....	158
c.Vecteurs viraux et anticorps dirigés contre le récepteur 4-1BB (CD137).....	164
d.Vecteurs viraux et anticorps dirigés contre DR5.....	164
e.Vecteurs viraux et anticorps dirigés contre un marqueur tumoral.....	164

QUATRIÈME PARTIE : LIMITES ET PERSPECTIVES DE L'UTILISATION DES VECTEURS VIRAUX DANS L'IMMUNOTHÉRAPIE ANTITUMORALE.....166

A. VECTEURS VIRAUX DANS L'IMMUNOTHÉRAPIE ANTITUMORALE : LIMITES ET AMÉLIORATIONS PROBABLES167

I. <i>Vecteurs viraux et immunogénicité potentielle</i>	168
a.Vecteurs viraux et immunogénicité : exemple tragique.....	168
b.Vecteurs viraux et immunogénicité : diminution de l'efficacité.....	168
i.Vecteur viral et induction d'une réponse immunitaire.....	168
ii.Vecteurs viraux et excrétion virale.....	170
iii.Vecteurs viraux, immunogénicité et immunothérapie antitumorale.....	170
II. <i>Vecteurs viraux : réduction des effets secondaires</i>	171
a.Vecteurs viraux et doses efficaces	171
b.Vecteurs viraux et voie d'administration.....	171
i.Transduction ex vivo.....	171
ii.Transduction in vivo : administration intratumorale ou systémique.....	171
c.Vecteurs viraux et ciblage par modification de surface.....	172
III. <i>Vecteurs viraux et risques liés à l'intégration</i>	174
a.Exemple tragique 2 : les vecteurs viraux peuvent tuer.....	174
b.Vecteurs viraux et intégration au génome.....	175

B.UTILISATION DES VECTEURS VIRAUX DANS L'IMMUNOTHÉRAPIE ANTITUMORALE À VENIR.....	177
<i>I. Vecteurs viraux et associations de stratégies.....</i>	<i>177</i>
a.TRICOM.....	178
<i>i.Stratégie.....</i>	<i>178</i>
<i>ii.Applications actuelles.....</i>	<i>178</i>
b.Inactivation des Treg.....	180
<i>i.Définition des Treg.....</i>	<i>180</i>
<i>ii.Vecteurs viraux et Treg : application.....</i>	<i>180</i>
c.Vaccination double utilisant deux types de vaccin différents dirigés contre le même antigène.....	181
<i>i.Stratégie.....</i>	<i>181</i>
<i>ii.Resultats.....</i>	<i>181</i>
 <i>II. Vecteurs viraux et immunothérapie antitumorale : une application vétérinaire ?.....</i>	<i>182</i>
CONCLUSION.....	185
Références bibliographiques.....	186
Annexe 1 : Caractéristiques et résultats des patients de l'étude de Dummer R et al. 2008.....	224
Annexe 2 : Abréviations	225

Table des illustrations

Figure 1 : Diagramme schématique des différentes stratégies de l'immunothérapie.....	10
Figure 2 : Reconnaissance spécifique et activation du LT par une CPA.....	37
Figure 3 : Les vecteurs viraux, des transporteurs de gène dans la cellule, exemple des adénovirus	48
Figure 4 : Structure du virion d'adénovirus C (adénovirus 2 ou 5).....	52
Figure 5 : Structure du génome de l'adénovirus 2.....	53
Figure 6 : Induction d'une immunité protectrice par immunisation avec CD/AdNeuTK-.....	58
Figure 7 : Déplétion in vivo de cellules T CD4+ et CD8+ au cours de l'immunisation de souris avec CD/AdNeuTK- et épreuve tumorale.....	60
Figure 8 : Suppression de tumeurs sous-cutanées préexistantes par administration de CD/AdNeuTK- ou CD/AdNeuTK-/AdmIL-12.....	61
Figure 9: Sécrétion d'IFN γ par des lymphocytes humains transduits par de l'ARN codant pour la GFP (contrôle), ou les TCR réagissant avec les TAA MART-1, gp100, NY-ESO-1, p53.....	65
Figure 10 : Cycle de réplication rétroviral	66
Figure 11 : Structure du génome et de la capside du VIH1.....	68
Figure 12 : Régression cancéreuse chez deux patients.....	72
Figure 13 : Détection par RT-PCR de OVA dans les nœuds lymphatiques drainants après l'injection directe de vecteurs lentiviraux.....	75
Figure 14 : Activité cytolytique in vitro.....	76
Figure 15 : Quantification par ELISPOT de cellules T spécifiques produisant de l'IFN γ	77
Figure 16 : Principales étapes de la réplication des poxvirus dans leur ordre chronologique de 1 à 9.....	86
Figure 17 : Réponse clinique de la tumeur injectée du patient 22.....	104
Figure 18 : Effet de l'injection de DISC-GMCSF en i.t. sur des modèles syngéniques de tumeurs	113
Figure 19 : Présentation schématique de la virothérapie oncolytique.....	116
Figure 20 : Structure schématique de AdCN103, AdCN205-EGFP, AdCN205-IL-24.....	131
Figure 21 : Expression du transgène dans les cellules tumorales (SW620 et BEL7404) et cellules normales (QSG7701 et MRC-5) après infection par des adénovirus oncolytiques AdCN205-IL-24 , Ad-IL24 ou AdCN205-EGFP.....	132
Figure 22 : Réplication conditionnelle de vecteurs adénoviraux oncolytiques in vitro.....	133
Figure 23 : Activité antitumorale de vecteurs oncolytiques dans des tumeurs établies dans un modèle animal	136
Figure 24 : Traitement in vivo sur des tumeurs B16.....	144
Figure 25 : traitement in vivo sur des tumeurs TC-1.....	145
Figure 26 : Épreuve cytotoxique in vitro.....	147
Figure 27 : Expression in vitro d'anticorps dans les cellules L-02 infectées par Ad5-Tab.....	159
Figure 28 : Liaison spécifique de l'anticorps anti-Her-2 exprimé par Ad5-Tab.....	161
Figure 29 : Concentration sérique en anticorps anti-HER-2 de souris nues inoculées par SKOV-3 en fonction du temps.....	162
Figure 30 : Activité antitumorale des anticorps anti-HER-2 générés par Ad5-Tab dans les tumeurs portées par des souris nues.....	163
Tableau 1 : Patientes recrutées dans l'essai clinique.....	90
Tableau 2 : Propriétés des différents virus oncolytiques, avantages et inconvénients des avancées des essais cliniques	119
Tableau 3 : Caractéristiques des vecteurs viraux utilisés dans l'immunothérapie antitumorale	167
Tableau 4 : Vaccins vétérinaires à base de vecteurs viraux accrédités pour l'utilisation commerciale	182

Introduction

De nos jours, le cancer représente la plus grande cause de mortalité derrière les maladies cardio-vasculaires. Alors qu'il est l'une des maladies les plus étudiées et que de nombreux efforts ont été réalisés pour le prévenir et le traiter, les chiffres actuels sont alarmants. Si la tendance actuelle se poursuit, 16 millions d'individus, dont les deux tiers dans des nouveaux pays industrialisés ou des pays en développement, apprendront en 2020 qu'ils sont atteints d'un cancer, contre 10,9 millions en 2005. Ceci se traduirait par une mortalité de l'ordre de 10 millions par an en 2020.

Les thérapies courantes mises en place contre le cancer, comme la radiothérapie ou la chimiothérapie, révèlent souvent des effets trop limités, ce qui met en évidence la nécessité du développement de nouvelles approches pour le traitement des cancers.

Alors que les premières stratégies de thérapie génique se focalisaient initialement sur le rétablissement d'une fonction perdue dans le cadre de maladies monogéniques, une utilisation plus large de la thérapie génique s'est développée au cours de ces dernières années. En effet, la thérapie génique incluant des approches thérapeutiques *in vivo*, où l'induction de mort cellulaire a été investie, est utilisée cliniquement dans une grande variété de maladies familiales et acquises, incluant les cancers (Griesenbach U *et al.*, 2006 ; Cavazzana-Calvo M *et al.*, 2005 ; Chamberlain JS, 2002 ; Tangney M *et al.*, 2006). Un des plus grands obstacles de la thérapie génique a été le développement d'un véhicule pour transférer des gènes qui soit efficace, non pathogène, qui soit capable de transférer le matériel génétique dans une large gamme de cellules et de tissus et qui puisse maintenir une expression pour une période appropriée. Les virus sont des vecteurs attractifs pour la thérapie génique car ils ont une capacité innée pour infecter et délivrer de l'ADN dans les cellules.

L'immunothérapie est devenue l'une des voies de recherche majeure de la thérapie génique contre le cancer et elle consiste à stimuler le système immunitaire pour tuer les cellules tumorales et empêcher leur prolifération.

Nous étudierons dans une première partie, quels sont les objectifs et les principes de l'utilisation des vecteurs viraux dans l'immunothérapie antitumorale ainsi que les stratégies et outils à disposition. Dans une deuxième partie, nous verrons

comment ces vecteurs viraux sont utilisés dans l'induction ou la modulation d'une réponse immunitaire. La troisième partie sera consacrée à l'étude des associations possibles de l'immunothérapie utilisant des vecteurs viraux avec d'autres thérapies, comme la virothérapie oncolytique ou encore la thérapie monoclonale. Nous terminerons par un bilan et les perspectives à venir pour l'utilisation des vecteurs viraux dans l'immunothérapie antitumorale.

Première partie :

Vecteurs viraux et immunothérapie antitumorale : objectifs, principes, stratégies et outils

A. Objectifs de l'immunothérapie antitumorale

I. Définition de l'immunothérapie

L'immunothérapie est un terme large pour désigner un traitement qui consiste à administrer des substances stimulant les défenses immunitaires de l'organisme afin de lutter contre différentes maladies, en particulier certains cancers hématologiques, les maladies dégénératives et maladies de système. L'immunothérapie antitumorale utilise la modification génétique des cellules tumorales, des cellules de l'immunité et le transfert de gène (Fig 1). Par extension, elle désigne également toute thérapie utilisant des protéines synthétisées par les cellules du système immunitaire ; en particulier les immunoglobulines, sans que l'objectif de cette thérapie soit nécessairement la stimulation de l'immunité.

Les premiers essais d'immunostimulation eurent lieu avec l'administration de BCG (Bacille de Calmette et Guérin) et de lévamisole. En effet, le BCG a un effet non spécifique activateur de l'immunité à médiation cellulaire par activation des macrophages et des cellules *Natural killer* (NK) et le lévamisole est un stimulant immunitaire non spécifique.

A partir des années 1960, des « manipulations immunitaires » ont commencé avec les greffes de moelle osseuse, qui transfèrent des lymphocytes, cellules immunocompétentes, du donneur au receveur.

Ce qui nous intéresse présentement c'est l'immunothérapie utilisant des vecteurs viraux à visée antitumorale.

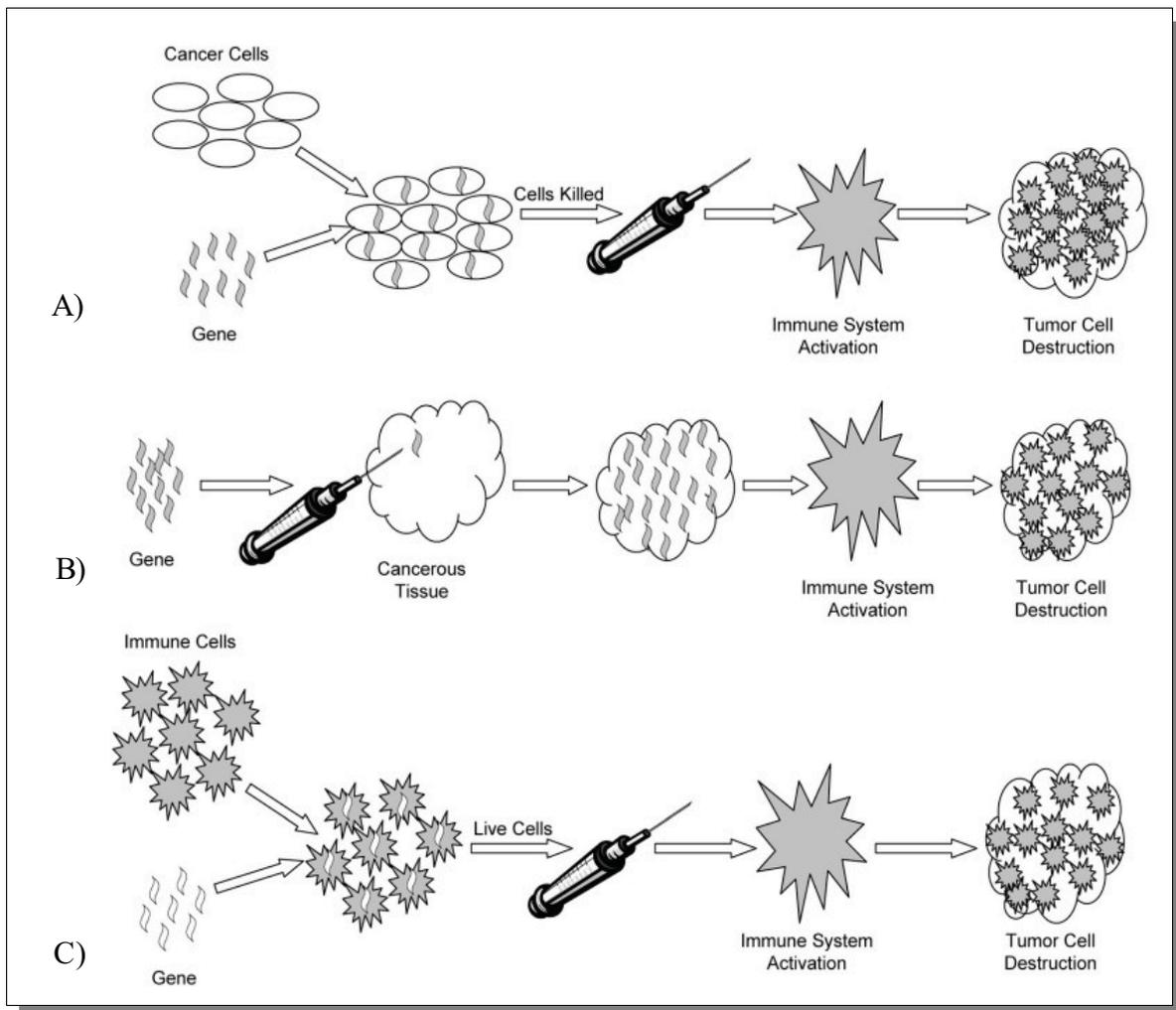


Figure 1 : Diagramme schématique des différentes stratégies de l'immunothérapie

(A) Immunothérapie utilisant les cellules cancéreuses modifiées ; (B) Immunothérapie avec administration de transgènes in vivo ; (C) Immunothérapie utilisant des cellules de l'immunité modifiées.

(Cross et Burmester, 2006)

II. Cancer : généralités, histoire et causes

a. Cancer : généralités

Au niveau mondial, les études statistiques actuelles indiquent que 24,6 millions de personnes vivent avec le cancer et qu'au moins une personne sur trois développera un cancer au cours de sa vie. Pour l'année 2005, les cancers ont été la cause de 6,7

millions de décès soit 30 % des décès liés à la maladie et 12,5% des décès en général (Source OMS 2005). Les principaux types de cancer responsables de la mortalité sont le cancer du poumon (1,3 millions de décès par an), le cancer de l'estomac (près d'1 million de décès par an), le cancer du foie (662 000 décès par an), le cancer du colon (655 000 décès par an) et le cancer du sein (502 000 décès par an) (Ferlay J *et al.*, 2005 et Jemal A *et al.*, 2008). Aujourd'hui, les cas de cancers les plus communément diagnostiqués sont, pour les hommes, le cancer de la prostate, des poumons et colorectal et pour les femmes, le cancer du sein, des poumons et colorectal.

Le cancer est mieux soigné aujourd'hui qu'il y a une vingtaine d'années (source OMS 2005). En 1950, aux États-Unis, 1900 enfants de moins de cinq ans mouraient d'un cancer. Leur nombre a aujourd'hui diminué de plus de 50%. La maladie de Hodgkin par exemple, un cancer du système ganglionnaire, autrefois presque toujours fatale, est guérie dans plus de 85 % des cas (Jemal A *et al.*, 2008). De nombreux types de cancers sont diagnostiqués chez l'homme avec une incidence dépendante de différents paramètres comme l'âge des individus ou leur alimentation (Colditz GA, 2007). Les progrès dans les domaines du dépistage et l'établissement d'un suivi médical chez les personnes à risque, permettent aujourd'hui une diminution sensible de certaines formes de cancer comme celle du col de l'utérus ou du sein (Coebergh JW, 1997). Le phénomène le plus frappant est la forte hausse de la mortalité due au cancer du poumon et des bronches dans les pays occidentaux : augmentation de plus de 50% pour les moins de 65 ans et plus de 200% pour les plus de 65 ans entre 1973 et 1990, liée essentiellement à la consommation intensive du tabac (Colditz GA, 2007). L'augmentation actuelle des cancers de la peau est également très marquante et certainement liée à une trop forte exposition de la peau aux ultraviolets (De Gruijl FR, 1999).

b. Cancer : historique

Le mot « cancer » d'origine latine (*cancer, cancri*), signifie « crabe », apparenté au grec « karkinos » (écrevisse).

Galien, médecin grec de l'époque romaine, décrivait ainsi le phénomène :

« Une tumeur qui s'étend des deux côtés par des prolongements anormaux qui envahissent les tissus adjacents. Cela ressemble aux pattes d'un crabe qui sont elles aussi présentes tout le long de la tête et du corps de l'animal » (Lynch HT *et al*, 1995).

1 000 000 d'années avant l'ère chrétienne : découverte de tumeurs osseuses sur les squelettes d'animaux préhistoriques.

10 000 ans avant J-C : un cancer osseux de l'humérus a été mis en évidence sur un guerrier de l'âge du fer (Munsigen en Suisse).

5000 ans avant J-C : des traces de tumeur de la peau ont été retrouvées sur un crâne dans la province de Semnan en Iran.

3 500 ans avant J-C : des papyrus égyptiens décrivent des tumeurs du sein traitées par cautérisation.

Pour Hippocrate (quatrième siècle avant J-C) le "carcinome" était une tumeur envahissante conduisant à une mort inéluctable. Le mot « karkinos » qui signifie crabe en grec évoque le crabe dévorant les tissus. On trouve dans Hérodote la description de la tumeur du sein d'Atossa, fille de Cyrus et femme de Darius.

Galien (130-200 ap. J-C) considérait que les tumeurs étaient dues à un excès « d'humeur » ; de bile noire qui se solidifiait dans certaines parties du corps comme les lèvres, la langue, les seins. Son traitement consistait en l'administration de purges pour dissoudre la bile solidifiée. Si la lésion ne régressait pas, il pratiquait alors l'excision. Ses théories furent valables pendant un millénaire.

Fallopian (1523-1562) décrivit plusieurs variétés de cancer sans pour autant proposer de nouveau traitement : il pratiquait l'excision et la cautérisation pour les lésions récentes et traitait les lésions avancées avec différents onguents. L'un de ses onguents préférés était à base d'arsenic (nous savons actuellement que l'arsenic est cancérigène !).

Les XVI^{ème} et XVII^{ème} siècles amènent de nombreuses avancées avec la fin de l'interdit religieux sur la dissection des cadavres et la découverte du système lymphatique par Descartes.

Sennert (1572-1637) provoque un recul sur la recherche contre le cancer en le désignant comme contagieux. Les cancéreux sont alors exclus de tous les hôpitaux pendant 2 siècles.

En 1585, Ambroise Paré, dans son traité des « *tumeurs contre nature* » décrit la tumeur du sein d'une dame d'honneur de la Reine Catherine De Médicis.

En 1666, La Reine Anne d'Autriche meurt d'un cancer du sein.

En 1693, Houppeville écrit un traité sur « *la guérison du cancer du sein* ». La théorie infectieuse qu'il défend fait croire à la contagion du cancer.

Henry François Le Dran (1685-1770) décrit le cancer comme une maladie locale s'étendant via les canaux lymphatiques. Il préconise l'excision de la tumeur et des ganglions lymphatiques axillaires. Il met en avant un pronostic défavorable lors de l'envahissement des ganglions axillaires (début de notion de métastases).

En 1775, Perceval Pott (1714-1788) met en évidence le premier cancer professionnel ; le cancer des bourses des ramoneurs, ce cancer était provoqué par le frottement sur le scrotum de la corde imprégnée de suie qui servait aux "petits ramoneurs" à descendre dans les conduits de cheminée.

En 1802, Xavier Bichat, puis Laennec, sont à l'origine de la théorie cellulaire moderne du cancer. Bichat précise la notion de métastase en la définissant comme différentes localisations du cancer, une seule maladie touchant le même tissu mais dans différents organes (Imbault-Huart Marie-José, 1985).

c. Cancer : causes majeures

Les causes de cancer sont nombreuses, elles ont augmenté avec l'industrialisation. Le taux de cancer est beaucoup plus élevé dans les pays industrialisés surtout pour des cancers très agressifs comme celui du poumon. Les causes peuvent être de différentes natures (Colditz GA *et al.*, 2006 ; Hill C, 2008) :

- **Virale : la théorie virale des cancers n'a, jusqu'ici, été retenue que dans environ 15% des cancers humains :**

- dans certaines leucémies et certains hématosarcomes ;
- le virus d'Epstein-Barr (herpès virus agent de la mononucléose infectieuse) est associé à la maladie de Burkitt, à certains cancers du naso-pharynx et certaines maladies de Hodgkin (variété de lymphome) ;
- le virus de l'hépatite B et celui de l'hépatite C jouent un rôle dans le cancer primitif du foie ;
- les papillomavirus, sexuellement transmissibles jouent un rôle dans les cancers ano-génitaux dont celui du col de l'utérus ; d'où l'intérêt de leur détection précoce ;
- l'infection par le virus VIH du SIDA est associée à une augmentation du risque de sarcome de Kaposi et de Lymphome Malin non Hodgkinien.

- **Parasitaire**

La bilharziose, due à l'infection par un parasite, est un facteur de risque pour le cancer épidermoïde de la vessie avec *Schistosoma haematobium* et pour des cancers coliques avec *Schistosoma mansoni*.

- **Rayonnante**

Tous les rayonnements sont susceptibles de provoquer des mutations génératrices de cancers. Le risque de cancer cutané chez les sujets exposés au soleil de façon excessive est particulièrement augmenté. L'explosion du réacteur de la centrale nucléaire de Tchernobyl en 1986 a provoqué la libération de quantités massives de Césium et d'Iode radioactifs et leur diffusion très large par le nuage radioactif. A ce jour, plus de 2000 cas de cancers semblent être imputables à cette irradiation massive. La thyroïde qui fixe sélectivement l'iode, a été une cible privilégiée et le nombre de cancers thyroïdiens pourrait être en augmentation de ce fait.

- **Hormonale**

Les œstrogènes représentent un facteur de croissance pour certaines cellules cancéreuses, ils doivent donc être maniés avec précaution.

- **Chimique**

Le tabac, l'alcool, l'amiante, les nitrites et de nombreux corps chimiques de l'environnement interviennent dans la genèse de nombreux cancers. Un certain nombre de cancers professionnels donnent droit en France à réparation.

- **Alimentaire**

Indépendamment de l'éthylotabagisme, certains types d'alimentation ou d'aliments (en particulier l'excès de certaines graisses et la consommation fréquente d'aliments fumés ou salés), tendent à augmenter le risque de certains cancers.

- **Traumatique**

Le grattage, les frottements, coups répétés ont un rôle dans certains cancers.

- **Génétique**

Les facteurs génétiques jouent un rôle incontestable dans certains cancers dits « héréditaires » ou « familiaux », mais ces cancers liés à une transmission génétique sont rares. L'étude de ces cancers familiaux permet de comprendre les mécanismes d'action des altérations génétiques dans la carcinogénèse et ouvre la voie à la thérapie génique. En revanche, les habitudes « environnementales » ont une influence certaine dans l'apparition de certains cancers dits « familiaux », sans qu'il y ait pour autant transmission de gènes particuliers.

Tous ces agents cancérigènes agissent en provoquant des mutations du génome de la cellule. Le cancer demande, soit une action répétée du facteur cancérigène (particulièrement pour certains cancers expérimentaux), soit une action conjuguée de

plusieurs facteurs.

III. Objectif de l'immunothérapie antitumorale

L'unique objectif de l'immunothérapie dans la lutte contre le cancer, comme toutes les thérapies anticancéreuses, paraît être la guérison totale des personnes atteintes de cancer. Idéalement, à l'échelle de l'organisme cela correspond à éviter la dissémination de cellules cancéreuses et ainsi empêcher le développement de métastases, et surtout l'élimination des cellules tumorales. Le but étant de faire disparaître les tumeurs totalement ou au moins de les faire régresser jusqu'à une taille acceptable pour permettre une exérèse chirurgicale qui soit optimale.

Actuellement, les thérapies à base de substances chimiothérapeutiques sont largement utilisées avec tous les effets secondaires qu'on leur connaît. En effet, la majorité de ces substances fonctionnent par arrêt de la mitose en ciblant les cellules à division rapide ; ce qui englobe les cellules tumorales mais aussi les cellules sanguines, les cellules épithéliales intestinales, cellules des follicules pileux, etc. Par conséquent, leur utilisation en thérapie anticancéreuse se révèle systématiquement toxique pour les patients.

La radiothérapie consiste en l'exposition des cellules tumorales à un rayonnement afin d'empêcher leur multiplication, et à terme, leur destruction. Cette thérapeutique connaît également ses effets secondaires par irradiation des tissus sains adjacents.

Chimiothérapie, radiothérapie et chirurgie peuvent être combinées de toutes les façons, selon le type de cancer à guérir.

Découvrir de nouvelles thérapies efficaces contre le cancer avec des effets secondaires moindres serait idéal. L'immunothérapie apparaît être un tournant prometteur dans la lutte anticancéreuse, son objectif est l'éradication de cellules néoplasiques sans affecter les cellules saines, quelle que soit leur localisation, notamment dans les métastases.

Avant de développer l'utilisation des vecteurs viraux dans l'immunothérapie antitumorale, observons quels sont les principes de cette thérapie.

B. Principes de l'immunothérapie antitumorale

L'immunothérapie anticancéreuse consiste à faire développer à l'organisme atteint une réponse immunitaire efficace contre les tumeurs. En effet, le principal problème rencontré par l'organisme face à une tumeur qui se développe en cancer est sa réponse immunitaire qui est inefficace ou inadaptée. Nous ferons dans un premier temps un rappel sur les bases de l'oncogénèse et sur l'immunité antitumorale, puis nous aborderons les raisons de l'inefficacité immunitaire et les grands principes de l'immunothérapie antitumorale.

I. Rappel sur l'oncogénèse

La recherche a permis l'apport d'une importante quantité d'informations scientifiques, notamment par la mise en évidence de changements dynamiques au niveau du génome cellulaire durant l'évolution de la maladie. Ainsi, Bishop *et al.* ont démontré l'existence de mutations générant le phénotype tumoral dans les cellules animales, après l'expression d'oncogènes (gènes favorisant la croissance cellulaire) (Bishop JM, 1996 ; Huang PS, *et al.*, 1997) ou de mutants de gènes suppresseurs de tumeur (Bishop JM *et al.*, 1996). De nombreuses études indiquent que, chez l'homme, la tumorigénèse se déroule en plusieurs étapes, par successions d'altérations génétiques permettant la transformation progressive d'une cellule humaine normale en cellule tumorale (Hanahan D *et al.*, 2000). L'analyse anatomopathologique des organes atteints révèle des lésions représentatives d'étapes intermédiaires (stades « pré-malins ») de l'évolution de la maladie (Foulds L, 1954). Ces observations se sont concrétisées par de nombreux travaux montrant l'altération invariable du génome des cellules tumorales à de nombreux sites, par des mutations ponctuelles ou des changements chromosomiques (Kinzler KW *et al.*, 1996). Le développement tumoral se déroule ainsi par une succession de changements génétiques, conférant des avantages

au niveau de la croissance, et qui permettent une conversion progressive d'une cellule normale en cellule tumorale (Nowell PC, 1976).

Les cellules tumorales sont caractérisées par des modifications conduisant aux altérations de certains circuits de régulation gouvernant la multiplication et l'homéostasie des cellules normales. Le développement de tumeurs nécessite plusieurs altérations ce qui explique certainement la plus faible fréquence des cancers dans la première moitié de vie de l'homme. En fait, 7 altérations essentielles de la physiologie cellulaire dictent collectivement la progression tumorale (Hanahan D, *et al.*, 2000) :

- ◆ un potentiel de réplication illimitée ;
- ◆ une autonomie de production de signaux de croissance endogènes ;
- ◆ une insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance ;
- ◆ une angiogénèse activée et prolongée ;
- ◆ une capacité d'invasion des tissus induisant les métastases ;
- ◆ une résistance à l'apoptose ;
- ◆ une instabilité génétique.

Des détails concernant ces altérations sont présentés dans les paragraphes suivants. La compréhension de ces altérations est à la base de toute étude visant à une thérapie antitumorale.

a. Les cellules tumorales ont un potentiel de réplication illimitée

Toute cellule de mammifère est soumise à une limitation de sa multiplication. Ainsi, les travaux de Hayflick *et al.* ont permis de démontrer que des cellules normales ont un potentiel de réplication limitée (Hayflick L, 1997) qui, lorsqu'il est dépassé, les fait entrer dans un état qualifié de «sénescence».

En culture, la sénescence de ces cellules peut être levée en inactivant les

protéines pRb et p53. Ces cellules recommencent alors à proliférer jusqu'à un deuxième stade de «crise» caractérisé par une mort cellulaire massive, un désordre caryotypique avec fusion des chromosomes et émergence dans 1 cas sur 10^7 d'une cellule immortalisée (Wright WE *et al.*, 1989). Cette cellule immortalisée, ayant échappé à la double barrière anti-proliférative, possède un potentiel de réplication illimitée conduisant irrémédiablement à la croissance tumorale.

Le mécanisme intervenant dans le maintien de la capacité de croissance des cellules tumorales ou, au contraire, de l'inhibition de la croissance des cellules normales a été découvert au cours de la dernière décennie et fait intervenir les télomères situés à l'extrémité des chromosomes (Deng Y *et al.*, 2007). Ceux-ci sont composés de centaines de séquences répétées de 6 paires de bases qui, au fur et à mesure des divisions cellulaires, subissent une perte de 50 à 100 paires de bases à l'extrémité de chaque chromosome. Cette érosion progressive est le fait de l'incapacité des ADN polymérase à répliquer complètement les parties 3' de l'ADN chromosomique pendant la phase S du cycle cellulaire (Hanahan D *et al.*, 2000). En fin de vie cellulaire, les extrémités des chromosomes sont mises à nu par manque d'activité de la télomérase ; les chromosomes entrent alors en fusion, induisant invariablement l'entrée de la cellule en «crise» (aneuploïdie) et sa mort programmée (Shay JW *et al.*, 2005).

Afin d'échapper à cette mort programmée, les cellules tumorales ont développé un mécanisme permettant d'éliminer le phénomène d'érosion télomérique. Ainsi, toute cellule tumorale possède une activité de maintien de ses télomères par deux mécanismes distincts (Holt SE *et al.*, 1999). Dans 85 à 90% des cas, une sur-expression de l'enzyme télomérase ajoute des séquences répétées d'hexanucléotides à l'extrémité des chromosomes. Cette condition est nécessaire et suffisante pour permettre à des cellules normales d'acquérir une autonomie de réplication illimitée par transfert du gène de la télomérase (Bodnar AG *et al.*, 1998). Dans 10 à 15% des cas restants, les extrémités télomériques sont maintenues par recombinaisons inter-chromosomiques (Brachner A *et al.*, 2006).

Quels que soient les mécanismes utilisés, ceux-ci permettent de maintenir la longueur des extrémités télomériques au-delà d'un certain niveau ainsi que la

multiplication illimitée des cellules descendantes.

b. Autonomie des cellules tumorales vis à vis des signaux de croissance

Le cycle cellulaire normal nécessite des signaux de croissance mitogènes afin d'évoluer d'un stade quiescent vers un stade de prolifération active (Hanahan D *et al.*, 2000). Le cycle cellulaire normal est divisé en quatre phases principales (G0/G1, S, G2, M) régulant l'ensemble des mécanismes de la division cellulaire. Des signaux de croissance sont transmis à la cellule par des récepteurs transmembranaires où se lient spécifiquement des molécules de signalisation. Ce sont des facteurs de croissance solubles, des composants de la matrice extracellulaire ou des molécules permettant l'adhésion ou l'interaction entre deux cellules.

Dans le cas des cellules tumorales, trois mécanismes interviennent dans l'acquisition d'une autonomie de production de signaux de croissance mitogènes :

- ◆ l'altération des signaux de croissance extracellulaires ;
- ◆ l'altération des signaux permettant la transduction de signaux de croissance entre les cellules ;
- ◆ l'altération des circuits intracellulaires (Hanahan D *et al.*, 2000).

De nombreux oncogènes agissent en mimant les signaux de croissance cellulaire et permettent aux cellules tumorales de générer une grande partie des signaux de croissance dont elles ont besoin et de réduire ainsi leur dépendance vis à vis des tissus normaux présents dans leur micro-environnement. Dans certains cas, il se crée une rétro-action positive de production de ces facteurs appelée stimulation autocrine. La production de PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) et de TGFβ (*Transforming Growth Factor β*) par les cellules de glioblastomes et de sarcomes respectivement en sont deux exemples (Fedi P *et al.*, 1997).

i. Sur-expression de récepteurs cellulaires de surface

Les récepteurs cellulaires de surface permettant la transduction intracellulaire de signaux stimulant la croissance sont également la cible d'altérations et de dysfonctionnements au cours du développement tumoral (Hanahan D *et al.*, 2000). Ceux-ci sont sur-exprimés dans de nombreuses formes de cancer et permettent la sensibilisation des cellules tumorales à des niveaux très bas de facteurs de croissance, normalement insuffisant pour induire la prolifération cellulaire (Fedi P *et al.*, 1997). Le récepteur à l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) par exemple, est sur-exprimé dans les tumeurs de l'estomac, du cerveau et du sein, alors que le récepteur HER2/neu est exprimé dans les tumeurs de l'estomac et dans les carcinomes mammaires (Yarden Y *et al.*, 1988). Une signalisation indépendante du ligand peut également être obtenue à travers des altérations structurales de ces récepteurs comme, par exemple, l'expression de versions tronquées du récepteur à l'EGF (Fedi P *et al.*, 1997).

ii. Sélection des récepteurs extracellulaires

D'autre part, les cellules tumorales peuvent faire varier les types de récepteurs extracellulaires (intégrines) qu'elles expriment, favorisant ainsi ceux qui permettent la transmission de signaux de croissance (Giancotti FG *et al.*, 1999). Ces récepteurs de surface cellulaire sont hétérodimériques et bi-fonctionnels et permettent la liaison physique entre la cellule et la matrice extracellulaire (Giancotti FG *et al.*, 1999). Les liaisons des récepteurs aux intégrines à la matrice extracellulaire permettent la transduction de signaux dans le cytoplasme, signaux qui vont influencer le comportement cellulaire en sortant les cellules de leur quiescence, en les rendant résistantes à l'apoptose et en leur permettant d'entrer dans un cycle cellulaire actif (Giancotti FG *et al.*, 1999).

iii. Libération de signaux mitogéniques

Chaque récepteur de facteur de croissance activé par son ligand ou chaque intégrine de croissance engagée avec un composant de la matrice extracellulaire peut activer la voie des MAP kinases SOS-Ras-Raf (Giancotti FG *et al.*, 1999). Cette voie de signalisation joue un rôle central dans la cascade de mécanismes complexes permettant la transmission du signal émis par la liaison ligand-récepteur-intégrine. Ainsi, dans près de 25% des tumeurs humaines, la protéine Ras est présente dans une forme structurale altérée permettant la libération d'un flux de signaux mitogéniques dans les cellules, sans la nécessité d'une stimulation continue par les régulateurs normaux agissant en amont (Medema RH *et al.*, 1993). Pour les carcinomes du colon par exemple, près de la moitié d'entre elles porte l'oncogène *ras* muté (Kinzler KW *et al.*, 1996).

De nouvelles voies effectrices dans l'induction de signaux de croissance cellulaire provenant de la cascade d'activation mitogénique SOS-Ras-Raf-MAPK, ont été découvertes (Rommel C *et al.*, 1998). Cette cascade semble être également liée à une grande variété d'autres voies de signalisation cellulaire permettant de nombreux effets biologiques (Rommel C *et al.*, 1998). Par exemple, l'interaction directe de la protéine Ras avec les PI3 kinases (promotrices de la survie cellulaire) permet l'induction de signaux de croissance suscitant des signaux de survie cellulaire (Downward J, 1998).

iv. Sur-expression de facteurs de transcription

Le facteur de transcription Myc et le complexe Mad-Max peuvent également intervenir dans ces signaux de croissance cellulaire. Pendant le développement cellulaire normal, l'association de Myc et Max induit la prolifération cellulaire (Foley KP *et al.*, 1999). Ce stimulus est régulé par les facteurs transcriptionnels de la famille Mad qui, en association avec Max contrent le stimulus prolifératif pour induire un stade cellulaire différencié (Foley KP *et al.*, 1999). Dans de nombreuses tumeurs, la sur-expression de l'oncogène *c-myc* déstabilise les complexes Mad-Max et favorise

l'association Myc-Max, induisant par conséquent la prolifération cellulaire (Kinzler KW *et al.*, 1996).

L'acquisition d'une autonomie au niveau des signaux de croissance par les cellules cancéreuses ne peut pas expliquer entièrement le développement tumoral. Les tumeurs sont des tissus complexes contenant d'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales, les fibroblastes ou des cellules du système immunitaire (Hanahan D *et al.*, 1996). Ainsi, la croissance d'une cellule est largement dépendante des cellules avoisinantes (signaux paracrines) ou des signaux délivrés par voie systémique (signaux endocrines) (Hanahan D *et al.*, 1996). En effet, il a été suggéré que les signaux induisant la prolifération des cellules carcinomateuses provenaient de composants des cellules stromales (Hanahan D *et al.*, 2000). De même, la présence de cellules inflammatoires attirées sur le site tumoral peut permettre également la croissance des cellules tumorales (Cordon-Cardo C *et al.*, 1999). Dans le cadre d'une thérapie antitumorale, ce paramètre est à considérer afin d'agir non seulement sur la cellule tumorale elle-même mais aussi sur son micro-environnement (stratégie anti-angiogénique par exemple).

c. Insensibilité aux inhibiteurs de signaux de croissance

Dans un tissu normal, de nombreux signaux anti-prolifératifs interviennent dans le maintien de la quiescence cellulaire et de l'homéostasie tissulaire. Ces signaux sont composés de facteurs d'inhibition solubles, ancrés dans la matrice extracellulaire et à la surface des cellules. Comme leurs homologues activateurs, les signaux de transduction inhibiteurs sont véhiculés par des récepteurs transmembranaires couplés à des circuits de signalisation intracellulaire (Hanahan D *et al.*, 2000). Ces signaux inhibiteurs peuvent bloquer la prolifération des cellules par deux mécanismes distincts :

- ◆ arrêt du cycle de prolifération active et transition en phase quiescente G0 (ce stade est réversible et peut être activé à nouveau par des signaux

extracellulaires activateurs) ;

- ◆ transition permanente du cycle cellulaire dans une phase post-mitotique associée à une différenciation phénotypique.

Ce sont donc essentiellement des facteurs intervenant dans la régulation du cycle cellulaire, notamment dans le maintien de la phase G1, qui régulent l'inhibition de la prolifération des cellules normales. A tout moment, les cellules interagissent avec leur environnement et échangent des signaux induisant leur quiescence, leur prolifération ou leur différenciation.

Au niveau moléculaire, l'ensemble de ces signaux anti-prolifératifs passe majoritairement par la protéine du rétinoblastome (pRb) et ses deux homologues p107 et p130 (Weinberg RA, 1995).

Dans un stade hypophosphorylé, pRb bloque la prolifération en séquestrant et en altérant la fonction des facteurs de transcription E2F, essentiels pour le passage de la phase G1 en phase S (Weinberg RA, 1995). Ce stade hypophosphorylé est notamment assuré par la molécule TGFβ agissant aux travers de nombreuses voies de signalisation permettant ainsi d'éviter la phosphorylation de pRb et l'avancement du cycle cellulaire au-delà de la phase G1 (Hanahan D, *et al.*, 2000). TGFβ induit la synthèse de protéines (p15INK4B et p21) qui bloquent les complexes cyclines CDK, responsables de la phosphorylation de pRb (Datto MB *et al.*, 1997).

Afin d'assurer son développement, une cellule tumorale doit donc échapper à ces signaux anti-prolifératifs. L'inactivation de la voie pRb libère E2F et induit la prolifération cellulaire, rendant ainsi les cellules insensibles aux signaux inhibiteurs. Cette inactivation est dirigée sur le récepteur au TGFβ qui est, en fonction des cellules tumorales, non fonctionnel, muté ou dérégulé (Markowitz S *et al.*). La protéine pRb peut, elle aussi, être absente après mutations de son gène cible ou encore éliminée par séquestration par des oncoprotéines virales comme la protéine E7 du papillomavirus humain (Dyson N *et al.*, 1989).

Les cellules tumorales ont également la capacité de réguler négativement l'expression des intégrines et d'autres molécules d'adhésion responsables de la

transmission des signaux inhibiteurs favorisant ainsi les signaux activateurs de prolifération. Toutes ces voies couplées au cycle cellulaire et à la voie pRb définissent le concept de « perte de suppression tumorale » applicable à la plupart des cellules tumorales humaines (Hanahan D *et al.*, 2000).

d. Capacité à stimuler l'angiogenèse

Toute cellule vivante au sein d'un tissu doit théoriquement se situer à moins de 100µm d'un capillaire sanguin afin d'assurer son apport en oxygène et en nutriments par le système vasculaire. Dans le cas d'une cellule tumorale, isolée dans un environnement prolifératif peu vascularisé, une néo-angiogenèse locale doit être induite afin d'assurer la survie du néoplasme (Folkman J, 1997).

Les facteurs pro-angiogéniques les plus connus sont ceux dérivés de la famille du *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF-A/B/C/D) et du *Fibroblast Growth Factor* (FGF-1/2). Ces facteurs se fixent sur des récepteurs à tyrosine kinase exprimés à la surface des cellules endothéliales (Parangi S *et al.*, 1996).

La première molécule inhibitrice d'angiogenèse décrite, la thrombospondine-1 (TSP-1), se fixe sur la molécule CD36, un récepteur trans-membranaire des cellules endothéliales couplé aux kinases intracellulaires Src-like (Bull HA *et al.*, 1994).

Plus récemment, de nouveaux inhibiteurs de l'angiogenèse, sécrétés par les tumeurs elles-mêmes, ont été identifiés dans des modèles murins de carcinogenèse, caractérisés par l'existence de nombreuses métastases ne se développant qu'en présence de la tumeur primitive (O'Reilly MS *et al.*, 1994). Ainsi, l'angiostatine a été identifiée dans le sang de souris injectées en sous-cutané avec des tumeurs dérivées de carcinome du poumon (3LL) (O'Reilly MS *et al.*, 1997). L'endostatine (fragment terminal COOH du collagène XVII) purifiée à partir du surnageant d'un hémangiome murin (EOMA), fait partie de cette famille d'inhibiteurs (O'Reilly MS *et al.*, 1997).

Aujourd'hui, plus d'une quinzaine de facteurs pro-angiogéniques et un nombre similaire d'inhibiteurs ont été décrits (Hagedorn M *et al.*, 2000).

Une angiogénèse active est essentielle pour un développement rapide et efficace des cellules tumorales. Celles-ci ont ainsi la capacité d'induire une conversion pro-angiogénique précoce (« *angiogenic switch* »), caractéristique phénotypique particulièrement visible dans les stades pré-néoplasiques (Pepper MS, 1997). Les bases de ce phénomène ont été largement étudiées dans des modèles de souris transgéniques (Carmeliet P *et al.*, 2000) et dans des lignées tumorales humaines (Compagni A *et al.*, 2000). Ces études ont permis de découvrir les mécanismes intervenant dans la balance angiogénique (Iruela-Arispe ML *et al.*, 1997). Ce phénomène passe, notamment, par l'altération de gènes suppresseurs de tumeur comme *p53* (Ravi R *et al.*, 2000) ou d'oncogènes comme *myc* (Ngo CV *et al.*, 2000). La conséquence de ces mutations induit la sur-expression, par les cellules tumorales de molécules pro-angiogéniques comme les VEGFs ou FGFs alors que parallèlement l'expression d'inhibiteurs tels que TSP-1 ou l'interféron- β est inhibée (Volpert OV *et al.*, 1997).

Une autre phase de régulation est réalisée par les protéases qui contrôlent la bio-disponibilité cellulaire des facteurs angiogéniques et angiostatiques. Ainsi, de nombreuses protéases peuvent libérer le bFGF séquestré dans la matrice extracellulaire (Whitelock JM *et al.*, 1996) alors que la plasmine peut être clivée pour donner naissance à l'angiostatine (Gately S *et al.*, 1997).

e. Invasion des tissus et métastases

Au cours du développement tumoral, des cellules néoplasiques s'évadent, plus ou moins tardivement de la tumeur primaire, envahissant les tissus avoisinants, et colonisent des organes à distance ; de nouveaux foyers tumoraux apparaissent alors. Ces développements métastatiques sont aujourd'hui responsables de 90% des décès dus au cancer (Sporn MB, 1996). Au sein de l'organe colonisé, les métastases néoformées apparaissent comme un amalgame de cellules normales et tumorales aux propriétés similaires à la tumeur primaire.

L'un des mécanismes qui confère le caractère métastatique aux cellules tumorales consiste en l'altération de plusieurs classes de protéines impliquées dans les

phénomènes d'adhésion.

Les molécules impliquées regroupent notamment, des immunoglobulines, des cadhérines calcium-dépendantes (adhésion cellule-cellule) ainsi que des intégrines (adhésion cellule-matrice extracellulaire). L'ensemble de ces interactions est intimement lié au cycle cellulaire.

i. Altération des fonctions de contact : E-cadhérine

L'une des altérations de contact les plus étudiées implique la E-cadhérine, molécule responsable de l'interaction cellule-cellule et qui est exprimée de manière ubiquitaire sur les cellules endothéliales (Aplin AE *et al.*, 1998). Le couplage des cellules par des ponts de E-cadhérine inhibe leur prolifération et transmet ce signal via la β -caténine vers des circuits intracellulaires impliquant les facteurs de transcription Lef/Tcf (Christofori G *et al.*, 1999). La fonction E-cadhérine est inhibée dans la majorité des cancers épithéliaux par des mécanismes impliquant des mutations dans les gènes de la E-cadhérine et de la β -caténine, une répression transcriptionnelle ou encore la protéolyse du domaine extracellulaire de la cadhérine.

La sur-expression de E-cadhérine dans des cellules en culture ou dans des modèles de souris transgéniques inhibe le phénotype métastatique et invasif des cellules tumorales (Christofori G *et al.*, 1999).

La E-cadhérine semble essentielle à la suppression active du caractère invasif et métastatique des cellules tumorales épithéliales alors que son élimination est un point fondamental de cette évolution métastatique.

ii. Altérations des fonctions de contact : CAM

La modification de l'expression des molécules d'adhésion (CAM) de la superfamille des immunoglobulines participe également au développement métastatique (Johnson JP, 1991). Ainsi, la molécule N-CAM suit un mécanisme de

réversion transformant cette molécule très adhésive en isoforme faiblement adhésive (voire même répulsive). Cette isoforme est retrouvée dans les tumeurs de Wilm, les neuroblastomes et le cancer du poumon à petites cellules (Kaiser U *et al.*, 1996).

iii. Altérations des fonctions de contact : intégrines

Un autre groupe de molécules impliquées dans la capacité métastatique des cellules tumorales est celui des intégrines (Aplin AE *et al.*, 1998). Afin de pouvoir coloniser avec succès les sites locaux et distants, les cellules tumorales migrantes s'adaptent à leur environnement en modifiant le spectre des intégrines α et β présentées à leur surface. Ces néo-permutations créent de nouveaux sous-types d'intégrines adaptés au micro-environnement. Les cellules de carcinome transforment leurs intégrines, normalement adaptées à la matrice extracellulaire des cellules épithéliales normales, en intégrines ($\alpha 3\beta 1$ et $\alpha V\beta 3$) capables de fixer les composants du stroma dégradés par des protéases (Lukashev ME *et al.*, 1998).

iv. Présence de métallo-protéases

Enfin, la capacité des cellules tumorales à produire des métastases, peut résulter de la présence de métallo-protéases extracellulaires associées à la surface cellulaire, qui sont sur-exprimées et converties dans leur forme enzymatique active (Stetler-Stevenson WG, 1999). L'amarrage des métallo-protéases à la surface des cellules tumorales facilite l'invasion du stroma et le passage des parois vasculaires à travers les couches épithéliales. Ces métallo-protéases interviennent aussi dans d'autres phénomènes angiogéniques de transmission de signaux de croissance (Bergers G *et al.*, 2000) qui contribuent aussi à amplifier le phénomène métastatique.

L'activation des protéases extracellulaires et l'altération de molécules de surface spécifiques jouent donc un rôle central dans la mise en place du développement

métastatique (Stetler-Stevenson WG, 1999). Cependant, les circuits de régulation et les mécanismes qui gouvernent ces changements semblent être différents d'un environnement tumoral à un autre.

f. Échappement à l'apoptose

La capacité des cellules tumorales à se multiplier n'est pas uniquement déterminée par leur taux de prolifération mais également par leur taux d'usure cellulaire (Pawelec G *et al.*, 1999). L'apoptose représente un élément important dans la génération de cette usure. Ce phénomène est présent dans tous les types cellulaires et peut être induit par un grand nombre de paramètres (endommagement de l'ADN, activation d'un oncogène, insuffisance en facteurs de survie ou encore une situation d'hypoxie) (Evan G *et al.*, 1998). Une régulation de l'apoptose a également lieu au niveau de la matrice cellulaire et/ou du contact cellule-cellule qui, lorsqu'ils sont interrompus, induisent l'apoptose. La machinerie apoptotique fait intervenir deux classes moléculaires, les cibles et les effecteurs (Pawelec G *et al.*, 1999) :

- ◆ les molécules cibles ou sentinelles, permettent la surveillance cellulaire. Elles comportent par exemple des récepteurs de surface, comme le couple IGF1/IGF2 et IGF1/Récepteur ou également l'IL-3 et son récepteur, qui se lient aux facteurs de survie ou de mort cellulaire (Lotem J *et al.*, 1996) ;
- ◆ les molécules effectrices permettent d'induire la mort cellulaire par apoptose, majoritairement par l'intermédiaire des couples de molécules Fas/Fas ligand et TNF α /TNF-Récepteur-1 (Ashkenazi A *et al.*, 1999).

Les membres de la famille Bcl-2 peuvent également avoir une activité pro-apoptotique (Bcl-XS, Bax, Bak, Bid et Bik) ou anti-apoptotique (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W et Mcl-1) en modulant la mort mitochondriale et la libération de cytochrome C.

La protéine p53 est aussi inductrice d'apoptose en augmentant l'expression de Bax par exemple (Pawelec G *et al.*, 1999).

Enfin, une autre famille d'effecteurs de l'apoptose est constituée de protéases

intracellulaires nommées caspases, activables par la protéine Fas ou par le cytochrome C (Thornberry NA *et al.*, 1998).

Les premiers travaux montrant un rôle de l'apoptose dans le développement tumoral remontent au début des années 1970. L'acquisition d'une résistance à l'apoptose fait partie du phénotype de la majorité des cellules tumorales et peut être la conséquence de mécanismes différents (Pawelec G *et al.*, 1999).

La découverte de l'oncogène *bcl-2*, sur-exprimé dans les lymphomes folliculaires, est une des premières études rapportant les propriétés anti-apoptotiques d'un oncogène (Vaux DL *et al.*, 1988). Sa co-expression avec l'oncogène *myc* induit la formation de lymphomes B en augmentant la survie des lymphocytes (Strasser A *et al.*, 1990). De plus, il a été rapporté que l'apoptose induite par la protéine Fas pouvait être bloquée par la protéine Bcl-2 dans certains types cellulaires (Thome M *et al.*, 1997).

L'expression d'un analogue du récepteur pour la molécule FasL, dans une grande proportion de cancers du poumon et du colon, permet également de désensibiliser la tumeur à une apoptose médiée par Fas (Pitti RM *et al.*, 1998).

La mutation de régulateurs pro-apoptotiques (gène p53 suppresseur de tumeur, muté dans plus de 50% des tumeurs humaines) appartient aux mécanismes de désensibilisation. Cette altération résulte dans l'inactivation de la protéine p53, importante dans la surveillance des phénomènes pro-apoptotiques (Harris CC, 1996).

La sur-expression de FLIP (*FADD-Like IL1 β -converting enzyme [FLICE]/caspase 8-Inhibitory Protein*), un inhibiteur de l'apoptose de la famille des ADED (*Anti-apoptotic Death Effector Domain*), a d'abord été observée dans les mélanomes (Harris CC, 1996). FLIP a également été mis en évidence dans les cellules humaines où il peut inhiber l'apoptose grâce à son homologie structurale avec la pro-caspase 8. La molécule FLIP bloque l'effet pro-apoptotique de Fas et des membres de la famille du récepteur TNF (TNF-R1, TRAMP, TRAIL-R) (Thome M *et al.*, 1997).

Enfin, les protéines de la famille IAP (*Inhibitor of Apoptosis*), inhibiteurs des caspases 3, 7, 9, peuvent contrôler l'apoptose mitochondriale induite par la molécule Fas (Deveraux QL *et al.*, 1999). Par exemple, la survivine, surexprimée dans les

tumeurs du poumon, du sein, du pancréas, de la prostate et du colon pourrait protéger les tumeurs de l'apoptose cellulaire (Ambrosini G *et al.*, 1997).

g. L'instabilité génétique

Une tumeur n'est pas constituée d'un seul clone cellulaire homogène. L'hétérogénéité des cellules tumorales provient d'une multitude de clones cellulaires créés par des mutations. La réplication génétique est généralement un procédé hautement précis, mais des carcinogènes cytotoxiques peuvent causer une instabilité génétique par altération de l'environnement cellulaire. Cette pression sélective par altération, favorise l'évolution rapide de clones cellulaires.

Dans un environnement sans molécule carcinogène, les cellules ne subissent qu'un faible taux de mutations et les mutations qui ont lieu sont délétères. Cependant, l'instabilité génétique peut être avantageuse pour une cellule isolée dans un environnement carcinogène hostile et instable. De nombreuses enzymes sont capables de détecter et de réparer différentes sortes de dommages génétiques, et la perte de ces fonctions réparatrices correspond à un type spécifique d'instabilité génétique (Blagosklonny MV, 2001).

Le mécanisme exact de l'instabilité génétique est encore inconnu, mais le taux auquel les mutations se produisent, suggère un phénotype clonal qui permet une accumulation rapide des dommages génétiques.

II. Rappel sur l'immunité antitumorale

L'étude de l'immunité antitumorale a débuté historiquement au XIX^e siècle par le constat de William Coley, chirurgien du *Memorial Hospital* de New York, que les malades atteints de cancer, développant parallèlement une pathologie infectieuse, présentaient des régressions de leur tumeur. Plus tard, la confirmation se fait par injection d'extraits de bactéries à des souris qui entraîne la nécrose hémorragique de

leur tumeur : les défenses immunitaires de l'organisme sont stimulées et limitent la prolifération cancéreuse.

L'induction d'une réponse immunitaire débute toujours par la reconnaissance d'un élément étranger ; il a été mis en évidence que la cellule tumorale pouvait être reconnue par le système immunitaire.

a. Reconnaissance de la cellule tumorale par le système immunitaire

L'immunosurveillance envers les cellules tumorales a été découverte, au départ un peu « par hasard », notamment lors d'autopsies, par la mise en évidence de tumeurs cliniquement silencieuses. Les observations de l'anatomopathologie sur des régressions spontanées de tumeurs ont confirmé l'existence de cette immunosurveillance. L'infiltration de certaines tumeurs par des cellules lymphoïdes (*Natural Killer* : NK, et lymphocytes) apparaît être l'argument le plus probant.

Depuis, des antigènes tumoraux ont été mis en évidence par culture de cellules issues de biopsie de tumeur primaire, en présence de lymphocytes périphériques du même sujet (Boon T *et al.*, 1995). Les antigènes tumoraux sont alors reconnus par les lymphocytes qui se différencient en lymphocytes T cytotoxiques (CTL) qui peuvent être clonés. Les clones sont alors utilisés pour sélectionner des sous-populations de cellules tumorales dont les génomes peuvent être comparés. Ainsi, ont été identifiés des gènes codant pour des antigènes dits « de tumeur ». Ils codent des protéines qui sont dégradées par la cellule et présentées à leur surface sous forme de peptide par l'intermédiaire des molécules d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). Un peptide est dit antigénique s'il est reconnu comme élément du non-soi par l'organisme : des lymphocytes T spécifiques de cet antigène peuvent alors être mis en évidence. Il est dit immunogène si cette reconnaissance est suivie de la mise en place d'une réponse immunitaire efficace.

i. Les antigènes spécifiques de tumeur

Lorsque leur expression est partagée par différents types histologiques de cancer, on les appelle les antigènes « publiques ».

Ils peuvent être le produit de l'expression d'un gène normalement présent dans le génome mais qui n'est pas censé être exprimé dans les cellules adultes, c'est le cas de la famille des gènes *MAGE* (*melanoma antigen*), *BAGE* (*bladder antigen*), *GAGE* (*gastric antigen*), *RAGE* (*renal antigen*) ou encore de l'alpha-fœtoprotéine. Dans les tissus normaux (sauf testicules et placenta), aucune expression des gènes *MAGE* n'est détectable. En revanche, dans 75 % des mélanomes on trouve au moins un des quatre gènes *MAGE* qui est largement exprimé. La protéine *HER-2/neu* est présente et sur-exprimée dans 40 % de cancers du sein ou de l'ovaire, alors qu'elle n'est pas détectable dans les tissus sains. Elle résulte de l'expression du proto-oncogène *HER-2/neu* qui est présent dans les cellules normales mais amplifié dans les cellules tumorales.

Ces antigènes peuvent aussi résulter d'un défaut de glycosylation : on trouve, en effet, dans les tumeurs du pancréas, de l'ovaire ou du sein, une glycosylation anormale de la mucine *MUC1* qui engendre des déterminants antigéniques nouveaux. Dans les tumeurs mammaires, 80 % des cellules tumorales sur-expriment le gène *MUC1*. La protéine *MUC1* qui en résulte peut être clivée, la partie soluble Ca 15.3 devient un antigène et représente un marqueur très utilisé dans le suivi des patientes atteintes de cancer du sein.

Un peptide antigénique peut encore résulter d'une mutation ponctuelle donnant naissance à une protéine anormale. Des oncogènes (*ras*) ou des gènes suppresseurs (*p53*) mutés peuvent se révéler à la fois oncogéniques et antigéniques. Pour exemple, 90 % des adénocarcinomes pancréatiques et 50 % des cancers du côlon présentent une protéine *p21ras*, connue pour son antigénicité et qui résulte de la mutation du gène *ras*.

Des protéines anormales (et antigéniques) peuvent encore résulter de

l'intégration de gènes viraux dans le génome de cellules tumorales. C'est le cas de certains virus, comme le virus d'Epstein Barr, de l'hépatite B ou encore des papillomavirus qui sont eux-mêmes inducteurs de cancers.

ii. Les antigènes associés aux tumeurs

Il s'agit du produit de gènes de différenciation exprimés de manière limitée dans les tissus sains, mais sur-exprimés ou amplifiés dans les tissus cancéreux correspondants. Par exemple, les protéines spécifiques des mélanocytes comme la tyrosinase, la gp100, gp75 ou Melan-A/MART1. Ce peut être également des protéines ubiquitaires associées à un état prolifératif comme la télomérase.

L'antigène prostatique (PSMA) et l'antigène carcino-embryonnaire (ACE) sont classés dans cette catégorie.

L'existence de lymphocyte T cytotoxiques spécifiques de tous ces antigènes de tumeurs a été mise en évidence chez des patients atteints de cancer et notamment au sein des populations de lymphocytes T infiltrant les tumeurs (TIL).

Il est donc établi que les cellules tumorales peuvent être reconnues par des cellules effectrices du système immunitaire. Après la reconnaissance, une réponse immunitaire est censée se mettre en place pour détruire les cellules tumorales.

b. Réponse immunitaire antitumorale censée se développer

i. Induction de la réponse immunitaire

Afin d'induire une réponse immunitaire contre les cellules tumorales, les antigènes de tumeurs doivent être présentés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) aux cellules effectrices. Les cellules dendritiques (CD), dites CPA professionnelles, sont les CPA les plus efficaces pour engendrer des effecteurs

cytotoxiques spécifiques des cellules tumorales. Elles présentent une certaine hétérogénéité tant sur le plan de leur origine hématopoïétique que de leur état de différenciation.

Les cellules dendritiques myéloïdes immatures sont disséminées dans la plupart des tissus et possèdent une aptitude particulière, comme les macrophages, pour les mécanismes d'endocytose et d'exocytose, elles jouent un rôle de sentinelle. *In vivo*, les antigènes exogènes (lysats, fragments ou encore corps apoptotiques de cellules tumorales) présents dans les tissus périphériques sont internalisés, s'en suit la migration des cellules dendritiques jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires, sous l'influence de différents facteurs (production de chimiokines dans un contexte inflammatoire). Ceci se produit lorsque l'immunité innée (cellules NK, macrophages) n'est pas parvenue à détruire toutes les cellules anormales.

C'est dans le nœud lymphatique que se met en place la réponse cellulaire. L'antigène est présenté par les molécules de classe II (CMH-II) à la surface des cellules dendritiques et est reconnu par des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques de cet antigène ; il s'agit du premier signal (reconnaissance du peptide comme du non-soi). S'il est accompagné de signaux dits de costimulation, les lymphocytes T seront alors activés. Il faut noter que le niveau d'expression de ces signaux est corrélé à l'état de maturation des cellules dendritiques.

Les lymphocytes T, une fois activés, sécrètent des cytokines, notamment l'interleukine-2 (IL-2) indispensables à leur multiplication. Ils favorisent aussi la maturation des CPA par engagement du ligand CD40L sur le récepteur CD40. Si les conditions et le contexte cytokinique sont optimaux pour la maturation, les cellules dendritiques sont alors capables d'activer les lymphocytes T CD8⁺ naïfs (Rodriguez A *et al.*, 1999). Elles sont les seules CPA à posséder cette capacité. Cette activation permet d'engendrer une réponse cytotoxique protectrice. Une maturation optimale des cellules dendritiques est obtenue lors de la présence de signaux de stress ou de « danger » (Matzinger P, 2002). Des CPA non professionnelles ne peuvent maintenir l'état d'activation des lymphocytes mémoires que si elles présentent à leur surface une certaine densité seuil de molécules présentatrices de peptides.

ii. Lyse des cellules tumorales

La phase effectrice d'une réponse immunitaire « idéale » est la lyse spécifique des cellules tumorales par les lymphocytes T cytotoxiques après leur activation. La lyse se réalise par un mécanisme de cytotoxicité dépendante de la perforine et des granzymes, ou par un mécanisme d'induction de l'apoptose par la fixation de la lymphotoxine ou du ligand de Fas des lymphocytes T CD8+ sur les récepteur du TNF (*Tumor necrosis factor*) ou Apo1/Fas respectivement (Bary M *et al.*, 2002).

Il apparaît évident que ces mécanismes présentent quelques défaillances face aux tumeurs sinon nous ne parlerions pas de cancer. Intéressons nous désormais à l'échappement des tumeurs face au système immunitaire.

III. Échappement des tumeurs à l'immunité

a. Une réponse immunitaire antitumorale souvent inefficace

Il est bien établi que les cellules tumorales sont reconnues spécifiquement par des cellules effectrices du système immunitaire. Des TIL ont été isolés et cultivés à partir de fragments tumoraux ou de nœuds lymphatiques et ont pu être évalués sur leur fonctionnalité. Leurs aptitudes à lyser les cellules tumorales *in vitro* d'une part, et sécréter des cytokines de type Th1 en réponse à la présentation d'antigènes spécifiques d'autre part, ont été ainsi confirmées. Pour que les cellules effectrices soient efficaces dans leur fonction lytique, il faut que le contact entre la cellule à lyser (qui présente l'antigène) et la cellule effectrice qui possède le récepteur T spécifique de cet antigène (TCR, *T Cell Receptor*) soit stabilisé par des molécules d'adhérence complémentaires, exposées à la surface des deux types cellulaires (Fig 2).

Malgré leur présence, ces effecteurs sont souvent inefficaces *in vivo* : la tumeur continue de se développer et différents organes peuvent être envahis de métastases.

Sont mis en cause des défauts de reconnaissance de la cellule tumorale ou

encore d'activation des cellules effectrices spécifiques. Les mécanismes moléculaires à l'origine de ces défaillances sont nombreux. Notons que les cellules tumorales sont initialement des cellules du soi, et bien qu'anormales, elles sont très faiblement inductrices de réponse immunitaire.

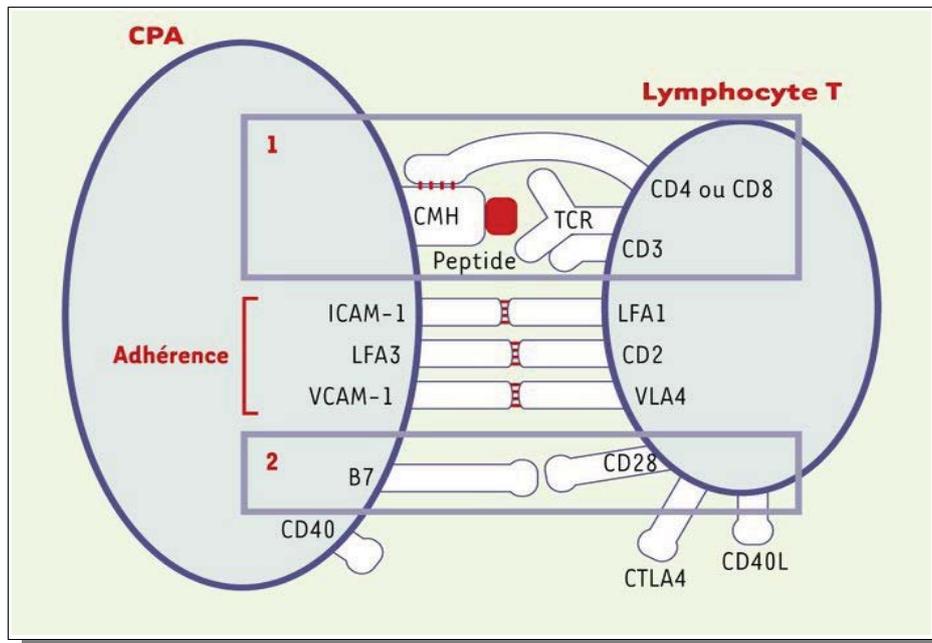


Figure 2 : Reconnaissance spécifique et activation du LT par une CPA.

(Catros-Quemener V *et al.*, 2003)

b. Induction d'une tolérance à l'égard des cellules tumorales

Chez certains patients atteints de mélanome métastatique, on peut trouver un important pourcentage de lymphocytes T CD8⁺ dans le tissu tumoral dont l'état fonctionnel peut être caractérisé. Ainsi, on pourrait considérer que la réponse immunitaire est efficace en l'absence de progression de la maladie. Cependant, pour d'autres patients, malgré la présence de T CD8⁺ dans la tumeur, les métastases progressent, alors que ces lymphocytes maintenus en culture dans les bonnes conditions s'avèrent cytotoxiques à l'égard des mêmes cellules tumorales. Ce qui laisse

suggérer que c'est souvent l'environnement qui est responsable de l'inefficacité de la réponse immunitaire. On note que chez ces derniers patients, les lymphocytes sont souvent localisés en périphérie de la tumeur, alors que dans les mélanomes de meilleur pronostic, les lymphocytes sont réellement infiltrants.

On peut admettre l'hypothèse de l'existence de mécanismes de tolérance à l'antigène qui aboutissent à l'anergie des lymphocytes spécifiques. Cette hypothèse a été émise suite à des observations expérimentales ; par exemple plusieurs variants cellulaires ont été produits à partir de tumeurs murines (carcinome du côlon DHOK12). Certains de ces variants sont greffés à des rats syngéniques et provoquent des tumeurs métastatiques très agressives car peu immunogènes : ce sont les variants progressifs PRO. D'autres variants très immunogènes donnent au contraire, chez l'animal, des tumeurs qui régressent spontanément : ce sont les variants régressifs REG. Lorsqu'un animal est greffé avec des cellules PRO, un état de tolérance à la tumeur s'installe. L'immunosuppression est telle chez ces animaux, qu'elle permet même la prise d'une greffe secondaire de cellules REG. A l'inverse, les rats immunisés avec des cellules REG peuvent rejeter une greffe de certains variants PRO (Bonotte B *et al.*, 1998). De plus, on constate désormais que l'état de tolérance induit par les cellules tumorales peut être relayé par une inaptitude des CPA dans leur fonction activatrice des cellules effectrices. La différenciation des cellules dendritiques serait bloquée à proximité des tumeurs mais aussi dans le sang périphérique des malades (Almand B *et al.*, 2001), or les cellules dendritiques immatures deviennent tolérogènes. En 2003, Cuenca *et al.* ont démontré que l'induction d'une tolérance immune résulte d'une transformation des antigènes, ainsi qu'une présentation des antigènes spécifiques de tumeurs par les CPA, inappropriée ou insuffisante (Cuenca *et al.*, 2003).

c. Les mécanismes d'échappement de la cellule tumorale

Malgré l'antigénicité avérée des tumeurs, elles continuent leur croissance en échappant au contrôle du système immunitaire. De multiples mécanismes sont mis en

jeu dans cet échappement.

i. La faible immunogénicité de la cellule tumorale

Cela participe au défaut d'induction de la réponse immunitaire ou de son maintien. En effet, le nombre de peptides exprimés à sa surface n'atteint pas le seuil de densité suffisant pour une reconnaissance efficace par le TCR. Ceci est dû à une expression déficiente des molécules du CMH dans la cellule tumorale. Cette faible immunogénicité peut également provenir de l'absence de molécules de costimulation à leur surface. Les tumeurs solides expriment peu ou pas les molécules de costimulation de la famille B7 : les lymphocytes spécifiques, en l'absence du second signal, deviennent anergiques (Pardoll DM, 1998).

De plus la cellule tumorale n'induit pas de réaction inflammatoire ni de signaux de « danger » qui jouent un rôle très important dans l'activation des cellules dendritiques (Matzinger P, 2002). Il en résulte que les antigènes tumoraux présentés sont assimilés à des peptides du soi. On observe alors une tolérance à l'encontre des cellules néoplasiques, qui ne sont pas détruites par les lymphocytes T devenus anergiques.

ii. La sécrétion locale de facteurs suppresseurs

Elle s'oppose à ce que les lymphocytes spécifiques mettent en place une réponse efficace. En effet, des cytokines inhibitrices peuvent être produites localement par les cellules tumorales (TGF β , IL-10 ou PGE-2) mais aussi par le stroma tumoral. Cet environnement favorise alors la transformation des lymphocytes T en Th2 sécréteurs de cytokines anti-inflammatoires ou en lymphocytes à fonction régulatrice (Th3) (Chouaib S *et al.*, 1997).

iii. La présentation des antigènes par les cellules tumorales peut être déficiente

La reconnaissance des antigènes par les lymphocytes spécifiques se fait si l'antigène est présenté à la surface par les molécules du CMH-I. Cette présentation résulte d'un processus d'adressage intracellulaire commun à toutes les cellules de l'organisme. Rappelons que les CMH-I présentent les peptides issus de la dégradation de protéines endogènes résultats de l'expression du génome de la cellule. Du fait de leurs anomalies génétiques et métaboliques, les cellules tumorales engendrent des protéines anormales. L'adressage intracellulaire comprend de multiples étapes, mais dans la cellule tumorale, des anomalies peuvent survenir à toutes les étapes de cet adressage. Des mutations portant sur les gènes du CMH-I, des transporteurs ou encore des altérations de sous-unités du protéasome ont été rapportées et peuvent être responsables d'un défaut de présentation des antigènes tumoraux.

iv. Les molécules d'adhérences aux lymphocytes peuvent faire défaut chez la cellule tumorale (LFA-3 ou ICAM-1).

La cellule tumorale peut également exprimer des molécules anti-adhérentes telles que les mucines ; elle échappe ainsi aux contacts avec les cellules compétentes.

v. Une adaptation aux défenses immunitaires

Elle a été mise en évidence en 2000 ; en effet, il existe des cellules résistantes à la lyse qui sont progressivement sélectionnées dans les populations tumorales (Bodey B *et al.*, 2000). Pour exemple, elles peuvent sur-exprimer, comme nous l'avons déjà évoqué, *bcl-2*, un gène anti-apoptotique.

Ainsi, par de nombreux mécanismes complexes, les tumeurs parviennent à échapper au contrôle du système immunitaire. Néanmoins, il en résulte globalement une importante immunosuppression et un environnement en faveur de la croissance tumorale et allant à l'encontre des défenses de l'organisme. Ces mécanismes

d'échappement représentent alors les cibles de l'immunothérapie.

IV. Principe de l'immunothérapie

Les caractéristiques immunosuppressives et faiblement immunogènes de la majorité des tumeurs humaines, ont poussé la communauté scientifique à évaluer des stratégies visant à induire ou à augmenter la réponse immunitaire antitumorale. Le concept de base est donc d'amplifier qualitativement et quantitativement les effecteurs de la réponse immunitaire antitumorale.

Deux concepts ont été explorés : la stimulation d'une réponse immunitaire dirigée contre un antigène tumoral spécifique (immunothérapie spécifique) et la stimulation d'une réponse immunitaire antitumorale indépendante de l'antigène (immunothérapie non spécifique).

a. Immunothérapie passive

Il s'agit d'un apport direct d'effecteurs cytotoxiques. L'équipe de Rosenberg obtenait en 1984 une réduction du nombre et de la taille des métastases dans plusieurs modèles de tumeur murine par des injections de lymphocytes activés, l'efficacité de ces cellules étant potentialisée par des injections d'IL-2 (Mulé JJ *et al.*, 1984).

Plusieurs équipes ayant confirmé des résultats observés sur des tumeurs murines, des essais cliniques ont été entrepris dans le traitement du cancer du rein et du mélanome. Les résultats obtenus avec des lymphocytes T CD8+, amplifiés à partir de pièces opératoires, se sont révélés insatisfaisants car la fréquence des lymphocytes T spécifiques des cellules tumorales demeure très variable d'un patient à un autre. Cependant des essais cliniques menés malgré les imperfections des protocoles ont donné des réponses complètes. Un essai français montre une augmentation significative de la survie sans rechute des patients traités par des lymphocytes activés par rapport au groupe témoin (Dreno B *et al.*, 2002).

b. Immunothérapie active

On peut différencier l'immunothérapie active spécifique et non spécifique.

L'immunothérapie active non spécifique fondée sur la stimulation globale du système immunitaire chez des patients atteints de cancer a fait ses preuves, le traitement des tumeurs non invasives de la vessie reposant sur l'injection intralésionnelle de BCG.

L'immunothérapie active spécifique repose sur la production *in vivo* de cellules effectrices capables de lyser les cellules tumorales.

Nous nous intéresserons uniquement à l'immunothérapie faisant intervenir la vectorisation par des virus.

C. Stratégies et outils

Les stratégies de l'immunothérapie ont pour objectif de rétablir une réponse immunitaire antitumorale efficace. Cela englobe donc toutes les stratégies qui parviennent à une reconnaissance de la cellule tumorale en tant que telle, afin que l'environnement soit optimal pour induire une réponse effective, et que la cellule tumorale soit lysée.

I. Stratégies de l'immunothérapie dans la lutte antitumorale

a. Induction d'une réponse immunitaire spécifique

La majorité des stratégies d'immunothérapie spécifique anticancéreuse est fondée sur l'expression d'antigènes spécifiques de tumeurs (TAAs : *tumor-associated antigens*). Ces antigènes incluent les produits de gènes mutés, des antigènes spécifiques de tissu sur-exprimés, et des protéines exogènes virales (Barth Jr RJ *et al.*, 1990 ; Van den Eynde BJ *et al.*, 1997). Ces antigènes associés aux tumeurs peuvent être rendus plus immunogènes qu'ils ne le sont *in vivo* et ainsi induire de façon efficace une immunité dirigée contre eux.

Le protagoniste clef de ces stratégies est la cellule dendritique, cellule présentatrice d'antigènes professionnelle entièrement équipée pour activer les lymphocytes T naïfs (Banchereau J *et al.*, 1998 ; Banchereau J *et al.*, 2000).

Nous étudierons les différentes utilisations des vecteurs viraux dans l'induction d'une réponse immunitaire contre ces TAA : transduction *in vitro* de cellules dendritiques et injection directe *in vivo* de vecteurs viraux porteurs de gènes codant ces TAA.

i. Transduction ex vivo de cellules dendritiques et immunothérapie anticancéreuse

La modification *ex vivo* des cellules dendritiques (CD) pour induire une réponse immunitaire est considérée comme une approche très prometteuse pour l'immunothérapie antitumorale. Cette méthode consiste à prélever les CD ou leurs précurseurs du patient et les mettre en culture afin de procéder aux étapes de différenciation, de maturation et de chargement par l'antigène. Ces CD modifiées sont ensuite réinjectées au patient.

La modification génétique des CD par transfert de gènes codant des antigènes spécifiques de tumeur présente l'avantage de permettre à des protéines hétérologues, exprimées par l'introduction de gènes, d'être considérées comme des protéines endogènes, et ainsi d'être prises en charge par les molécules du CMH de classe I (Yang *et al.*, 1995 ; Mack *et al.*, 1997) et d'être présentées aux lymphocytes T. Rappelons que les protéines extracellulaires sont présentées par les molécules du CMH de classe II qui s'associent au Lymphocytes T auxiliaires (LTa, CD4+), et les protéines intracellulaires sont présentées par les molécules du CMH de classe I qui s'associent aux Lymphocytes T cytotoxiques (LTc, CD8+).

La présentation de TAA aux lymphocytes T naïfs par les CD, modifiées génétiquement par les vecteurs viraux, permet idéalement d'induire une réponse immunitaire cytotoxique contre les cellules portant ces TAA.

Le fait de faire exprimer aux CD des antigènes spécifiques de tumeur *ex vivo*, permet d'assurer une bonne présentation de l'antigène et de s'affranchir des soucis d'adhésion et d'interaction avec la cellule tumorale pour induire une réponse. Cela permet d'éviter l'induction d'une tolérance à l'égard des cellules tumorales.

ii. Transduction directe in vivo et immunothérapie anticancéreuse

Elle consiste en l'injection directe de vecteur viraux codant pour un antigène spécifique de tumeur donné, qui en infectant les cellules, fera exprimer cet antigène, dans le but d'induire une réponse immunitaire spécifique efficace. L'administration

systémique de vecteurs viraux dans l'immunothérapie antitumorale n'est qu'à ses débuts et est entravée par quelques difficultés, notamment la reconnaissance du tissu tumoral.

b. Induction d'une modulation de la réponse immunitaire

Cette stratégie consiste à augmenter l'efficacité de la réponse immunitaire antitumorale induite en apportant *in situ* des molécules immunostimulatrices comme les cytokines ou les molécules de co-stimulation. Il peut également s'agir de transduction *ex vivo* de lymphocytes B, ou de cellules tumorales.

c. Immunothérapie combinée à la virothérapie et thérapie monoclonale

i. Virothérapie oncolytique en association avec l'utilisation de vecteurs viraux

Dans ce cadre, les vecteurs viraux utilisés sont des virus oncolytiques qui ont la capacité de se répliquer.

ii. Vecteurs viraux et thérapie monoclonale

Il s'agit d'utiliser les vecteurs viraux afin d'apporter des anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes de tumeur. L'avantage est que les anticorps sont produits à l'intérieur de l'organisme atteint et évite d'avoir à injecter des anticorps en quantité massive comme dans les thérapeutiques monoclonales initiales.

II. Outils utilisés

a. Molécules utilisées

i. TAA ou antigènes tumoraux

Nous appellerons TAA l'ensemble des antigènes associés aux tumeurs ; ils incluent des molécules comme le CEA (antigène carcinoembryonnaire) (Goldenberg DM *et al.*, 1976), HER-2/neu (Baxevanis CN *et al.*, 2004), et l'antigène spécifique de la prostate (PSA) (Horig H *et al.*, 2002) ainsi que les molécules de la famille MAGE et bien d'autres.

ii. Les cytokines

Elles ont un rôle important dans l'inflammation et la réponse immunitaire, et plus récemment, il a été montré qu'elles augmentent la réponse immunitaire antitumorale, induisent l'apoptose et diminuent l'angiogénèse. Les thérapies récentes contre le cancer cherchent à utiliser ces nouvelles propriétés (Dranoff G, 2004).

iii. Molécules de costimulation

Elles sont indispensables pour induire une réponse immunitaire spécifique ; elles interviennent dans le second signal nécessaire pour l'activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques par exemple.

iv. Anticorps

L'utilisation d'anticorps monoclonaux vise à empêcher la prolifération cellulaire en bloquant l'activité de récepteurs codés par des oncogènes. Par exemple, le trastuzumab (Herceptin[®]) est un anticorps monoclonal recombinant anti-HER2/neu (récepteur d'un facteur de prolifération cellulaire), structure moléculaire présente à la surface des cellules tumorales d'adénocarcinome mammaire (chez environ 30% des patientes). La liaison inhibe alors la transduction du signal, bloquant ainsi la croissance cellulaire et réduisant le potentiel malin de la tumeur (Tan AR *et al.*, 2002).

b. Vecteurs viraux utilisés

Un vecteur viral est un virus modifié pour transporter un gène thérapeutique au sein de cellules (Fig 3). Son utilisation repose sur le constat d'efficacité à transférer son génome dans les cellules cibles (humaines ou animales). La production d'un vecteur viral consiste en l'utilisation de virus modifiés génétiquement, dits sécurisés. Les séquences du virus qui codent des protéines liées à un comportement pathogène du virus sont supprimées, seules sont conservées les séquences permettant la construction de la particule virale et le cycle d'infection. Le génome est reconstruit pour porter le gène thérapeutique. Si des protéines virales viennent à manquer lors de la production de la particule virale thérapeutique, elles seront fournies par des cellules dites d'encapsidation ou productrices lors de la phase de production des vecteurs.

Certains virus permettent une expression durable du gène transféré, alors que d'autres ont la capacité de se développer dans les cellules en division ou non. A chaque stratégie de traitement doivent correspondre les fonctionnalités du virus utilisé en tant que vecteur.

Ces vecteurs peuvent être divisés en deux groupes : ceux qui ont été rendus non répliatifs et ceux qui sont répliatifs. Les virus non répliatifs sont utilisés en tant que vecteurs uniquement, alors que les virus répliatifs sont utilisés pour leur activité oncolytique. De plus, on peut diviser les vecteurs viraux selon qu'ils sont intégratifs ou non, c'est à dire s'ils intègrent ou non leur génome dans celui de la cellule hôte.

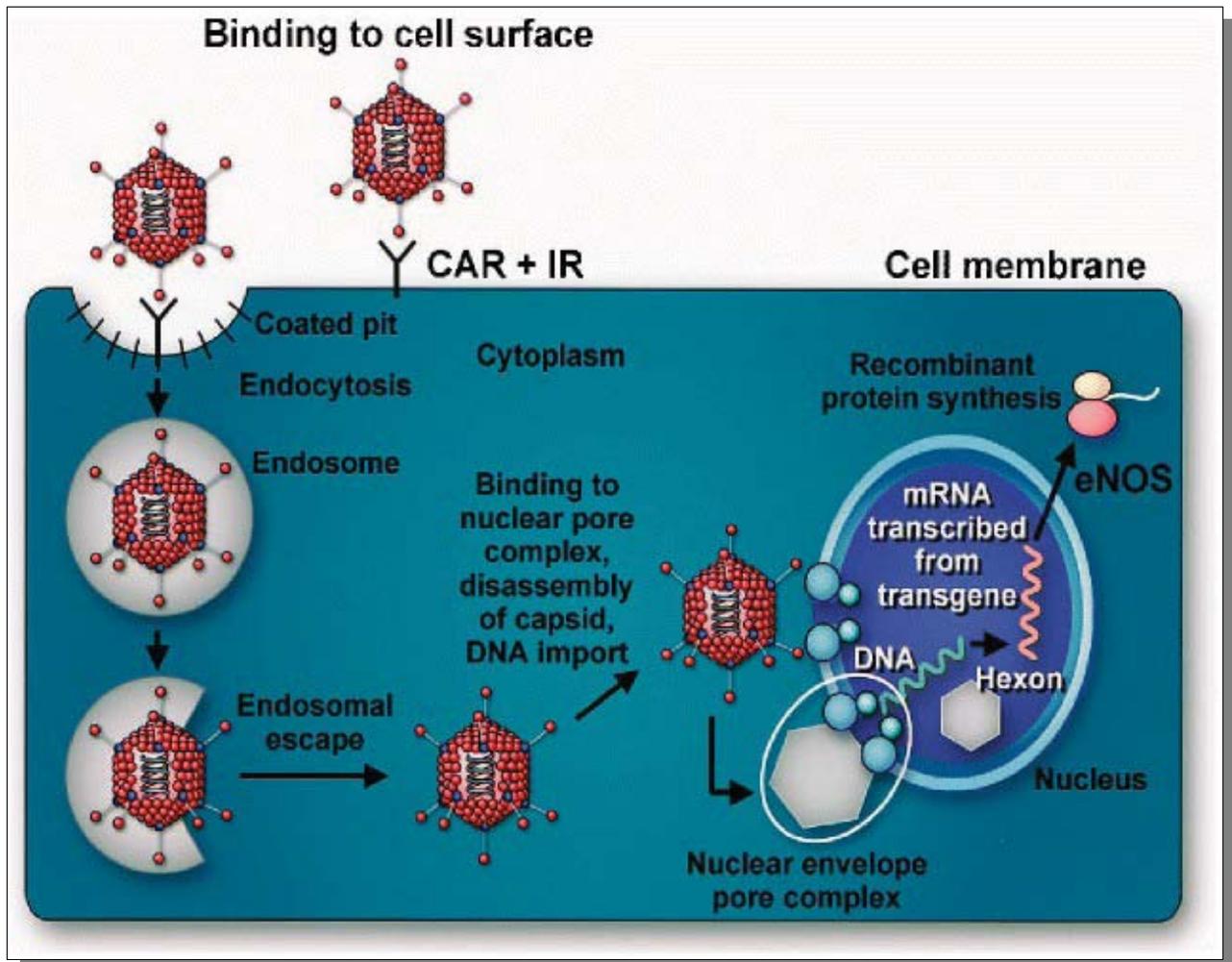


Figure 3 : Les vecteurs viraux, des transporteurs de gène dans la cellule, exemple des adénovirus

(Vini G Khurana and Fredric B Meyer, 2003)

L'immunothérapie anticancéreuse utilise généralement des vecteurs viraux non répliquatifs dérivés des rétrovirus, adénovirus, virus associés aux adénovirus (AAV), virus de la forêt de Semliki (SFV) et des virus herpes simplex (HSV). L'utilisation de vecteurs répliquatifs en immunothérapie anticancéreuse s'associe à la virothérapie oncolytique.

Chaque vecteur viral a ses caractéristiques qui orientent son utilisation vers une stratégie donnée, pour laquelle il sera plus approprié. Par exemple, les vecteurs dérivés du SFV permettent une expression du transgène assez fugace mais élevée et peuvent ainsi être utilisés pour induire une réponse immunitaire spécifique, alors que l'efficacité du transfert de gènes codant pour des molécules immunostimulatrices doit

être assurée par une assez longue période d'expression afin de permettre l'éducation du système immunitaire pour cibler la cellule tumorale. Les vecteurs appropriés pour cette stratégie sont dérivés des HSV, AAV, et adénovirus. En revanche, la transduction de cellules dendritiques *ex vivo* nécessite le maintien de l'expression d'une durée suffisante pour leur permettre d'assurer une vaccination efficace en exprimant elles-mêmes l'antigène tumoral : cette stratégie utilise généralement des vecteurs dérivés des rétrovirus, lentivirus et AAV, qui peuvent infecter facilement les cellules en division et s'intégrer dans le génome de la cellule hôte (CD, ici).

Conclusion de la première partie : après avoir rappelé quelques mécanismes fondamentaux sur l'oncogénèse et l'échappement des cellules tumorales à l'immunité, nous pouvons désormais aborder de façon plus détaillée l'utilisation des vecteurs viraux dans les différentes stratégies d'immunothérapie antitumorale, énoncées précédemment. Nous étudierons quelques exemples pour chaque stratégie afin d'en illustrer le propos.

Deuxième partie :

Vecteurs viraux et immunothérapie antitumorale : induction d'une réponse immunitaire antitumorale efficace

A. Vecteurs viraux et immunothérapie antitumorale : induction d'une réponse immunitaire spécifique

Comme nous l'avons vu, les antigènes tumoraux portés par la cellule tumorale ne sont en principe pas ou peu immunogènes. L'intérêt d'une vaccination antitumorale repose donc sur le principe que cet antigène peut être rendu plus immunogène et/ou administré dans des préparations vaccinales renforçant son efficacité (Nestle FO *et al.*, 1998). Des données pré-cliniques obtenues avec ce type d'approche ont conduit à la mise en place d'essais cliniques pour certaines de ces préparations antigéniques (PSA, MART-1, gp100, CEA et MAGE) (Gilboa E, 1998).

L'induction d'une réponse immunitaire spécifique, via des vecteurs viraux, repose sur la manipulation génétique de cellules dendritiques *ex vivo*, de manière plus anecdotique, sur la transduction de lymphocytes T *ex vivo*, ou sur l'injection directe *in vivo* des vecteurs viraux.

I. Transduction de cellules dendritiques *ex vivo* : applications

a. Stratégie

Une réponse immunitaire antitumorale efficace peut être induite *in vivo* et *in vitro* par des cellules dendritiques (CD) ayant été modifiées génétiquement.

La manipulation génétique *ex vivo* de CD pour induire une réponse immunitaire est considérée comme une approche très prometteuse de l'immunothérapie antitumorale. La facilité à les mettre en culture et les différencier *ex vivo* a permis le développement de cette stratégie.

L'approche vaccinale la plus étudiée utilisant des CD est leur modification génétique afin qu'elles expriment des TAA (*tumor-associated antigen*) pour induire ou augmenter une réponse immunitaire chez le patient. Rappelons que les CD sont des CPA (cellule présentatrice d'antigène) pourvues de la capacité unique d'induire l'activation primaire des lymphocytes T (Banchereau *et al.*, 2000).

L'intérêt majeur de cette stratégie est qu'elle permet de traiter des patients avec des cellules autologues modifiées génétiquement *in vitro* et d'induire une immunité spécifique contre les tumeurs en s'affranchissant des obstacles, dus à la faible immunogénicité des cellules tumorales, rencontrés naturellement.

b. Exemple : utilisation d'un adénovirus vecteur du gène ErbB-2/neu

(Chen Y *et al.*, 2001)

i. Adénovirus : présentation, avantages et inconvénients de leur utilisation en tant que vecteur

● Présentation

Les adénovirus humains sont constitués de 51 sérotypes différents, classés en six espèces (A à F selon le Septième rapport du Comité International de taxonomie virale).

Les adénovirus sont des virus icosaédriques d'environ 80 nm de diamètre. Ils sont constitués d'une capsidie formée de 240 hexons et de 12 pentons (Fig 4).

Le génome viral est composé d'une molécule linéaire d'ADN double brin de 36 kb, présentant à ses extrémités deux séquences répétées, les ITR (*Inverted Terminal Repeats*). Ces séquences contiennent une origine de réplication et sont ainsi nécessaires à la réplication virale. Le génome de l'adénovirus de type 5, dont dérive la majorité des vecteurs, a été entièrement séquencé (Chroboczek J *et al.*, 1992). L'ADN viral est organisé en unités de transcription précoce (Early: E1, E2, E3, E4), intermédiaires (IX et IVa2), et tardives (Late: L1, L2, L3, L4, L5). Les gènes précoces codent essentiellement des protéines régulatrices et liées à la réplication, alors que les gènes tardifs correspondent aux protéines structurales (Fig 5).

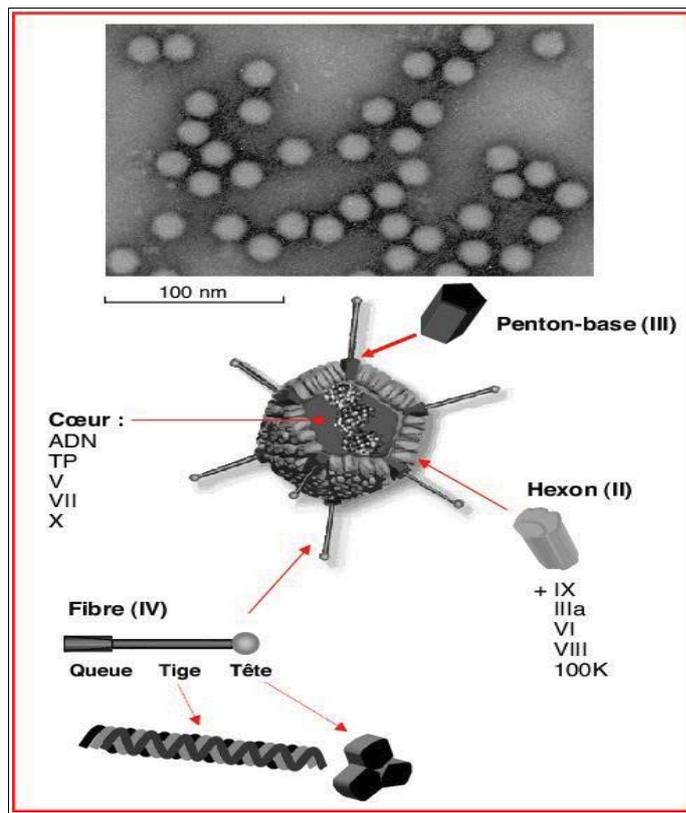


Figure 4 : Structure du virion d'adénovirus C (adénovirus 2 ou 5)

(Molinier-Frenkel V *et al.*, 2003)

Photographie en microscopie électronique (cliché de P. Boulanger et G. Torpier, Lille) et schémas représentatifs de la particule virale (schéma réalisé par les auteurs, VMF et PB, et modifié d'après une maquette du site Quantum) et des principaux éléments structuraux de la capside et du nucléoïde interne (schémas réalisés par VMF).

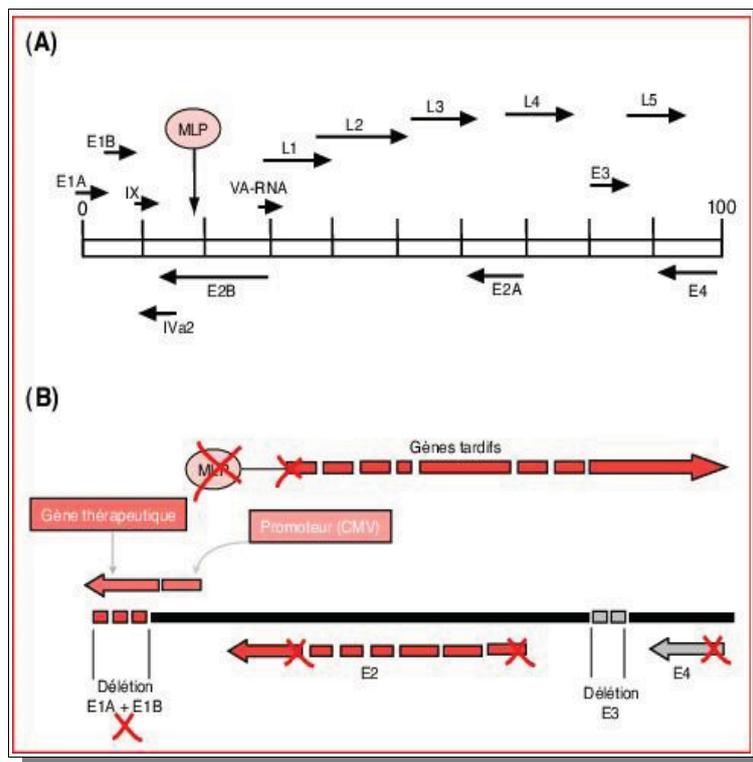


Figure 5 : Structure du génome de l'adénovirus 2

(A) Génome de l'Ad2 sauvage, avec ses régions précoces (E1 à E4), tardives (L1 à L5) et intermédiaires (IX, IVa2), ainsi que les deux régions transcrites en deux ARN de petite taille (viral associated RNA ou VA-RNA 1 et 2). Les flèches indiquent la direction de la transcription. MLP : promoteur tardif majeur.

(B) Structure schématique du génome d'un vecteur adénoviral de première génération. La région E1 est remplacée par un transgène thérapeutique gouverné par un promoteur fort (souvent le promoteur du gène IE du cytomégalovirus). La région E3 est également fréquemment déléetée afin d'augmenter l'espace disponible pour la cassette d'expression du transgène. En l'absence de E1A, l'activation des autres promoteurs n'a pas lieu et l'expression des autres gènes viraux est très diminuée (les croix rouges indiquent l'absence de transcription), ce qui rend le vecteur déficient dans sa réplication.

(Wold *et al.*, 1999)

Le cycle infectieux des adénovirus peut être divisé en deux phases. Cette réplication nécessite l'utilisation d'enzymes et de molécules de la cellule hôte, notamment l'ARN polymérase II. La première étape, comprend l'entrée du virus dans la cellule, le passage du génome au sein du noyau de la cellule infectée et l'expression des gènes précoces pendant la phase précoce. La réplication de l'ADN du virus est suivie par l'expression des gènes tardifs. Pendant cette phase tardive se produit l'assemblage des structures protéiques virales dans le noyau et la maturation des

particules infectieuses (Russell WC, 2000). Les produits des gènes précoces jouent un rôle important dans la transcription, dans la réplication et dans les interactions avec la machinerie cellulaire. Le gène E1A est le premier à être exprimé après l'infection virale et est un activateur transcriptionnel très important pour la suite de la transcription virale. E1A interagit avec la protéine du rétinoblastome (pRB), et beaucoup d'autres protéines cellulaires, induit l'entrée de la cellule dans le cycle cellulaire, pour promouvoir la réplication virale, mais E1A active aussi les voies de l'apoptose (Flinterman M *et al.*, 2003).

Le cycle lytique des adénovirus de groupe C (Ad2 et Ad5) est très efficace et résulte en la formation de 10 000 virions par cellule infectée, avec un excès de protéines et d'ADN viral, qui ne sont pas incorporés dans les virions. Chaque cycle dure entre 32 et 36 heures, dont 6 à 9 heures de phase précoce. Le cycle de réplication adénoviral ne requiert aucune intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte et aucun mécanisme d'intégration n'a été identifié pour l'adénovirus.

- **Avantages et inconvénients de leur utilisation en tant que vecteur**

Ces vecteurs sont caractérisés par un certain nombre de propriétés biologiques qui en font des candidats attrayants pour le développement de vecteurs de thérapie génique (Benihoud K *et al.*, 1999). Les adénovirus des types 2 et 5 (Ad2 et Ad5 = espèce C), d'où sont dérivés la grande majorité des vecteurs de thérapie génique, sont responsables, chez l'Homme, d'atteintes bénignes des voies aériennes supérieures (Benihoud K *et al.*, 1999). Leur pathogénicité est limitée, et n'est pas associée à l'activation d'oncogènes. Des vaccins produits à partir d'adénovirus de type 4 et 7 ont été, dans le passé, administrés chez l'Homme à grande échelle sans qu'aucun effet toxique majeur n'ait été rapporté (Randrianarison-Jewtougoff V *et al.*, 1995).

Ainsi, les vecteurs adénoviraux pourraient représenter un système sûr et efficace pour la vaccination ou le transfert de gènes (Imler JL, 1995).

Les recombinants adénoviraux sont produits à des titres élevés (10^{11} à 10^{12} particules infectieuses/ml). Ils possèdent un large spectre d'infection *in vitro* et *in vivo* (Benihoud K *et al.*, 1999).

Généralement, les particules virales ne sont pas inactivées par le système du complément. Les vecteurs possèdent une grande capacité d'insertion d'information génétique hétérologue jusqu'à 36 kb pour la troisième génération (Benihoud K *et al.*, 1999). Il est à noter que le génome viral ne s'intègre pas dans le génome cellulaire, ce qui diminue les risques d'induction de séquences oncogènes endogènes, mais d'autre part entraîne une dilution des cellules transduites à moyen et long terme.

De plus, concernant leur utilisation *in vivo*, la toxicité importante à fortes doses constitue la principale limitation à l'utilisation des vecteurs adénoviraux (Christ M *et al.*, 2000). La stimulation du système immunitaire de l'hôte conduit à un caractère transitoire de l'expression du transgène. Les réadministrations ultérieures sont inefficaces du fait d'une réponse humorale pré-existante qui induit la neutralisation virale (Benihoud K *et al.*, 1999). Par ailleurs des anticorps neutralisants dirigés contre les sérotypes qui ont infecté des individus durant la petite enfance, limitent la possibilité de traiter ces mêmes individus avec des vecteurs dérivés de ces sérotypes (Zhang WW, 1999).

De nombreuses études ont montré que la transduction de CD par un vecteur adénoviral exprimant un antigène de tumeur permettait un haut degré d'expression du transgène (Wan Y *et al.*, 1997 ; Zhong L *et al.*, 1999).

ii. Le gène de transfert ErbB-2/neu

ErbB-2/neu est un récepteur de la tyrosine kinase, appartenant à la famille des récepteurs de facteurs de croissance. Même si aucun ligand spécifique n'a été identifié, son activation permet par homodimérisation et hétérodimérisation avec d'autres

membres de la famille Erb, conduisant à la phosphorylation de la tyrosine-*trans* et la transduction d'un signal mitogène (Alroy I *et al.*, 1997 ; Graus-Porta D *et al.*, 1997). Ce récepteur est amplifié et sur-exprimé dans 20 à 30% des cancers pulmonaires, tumeurs de l'estomac et carcinomes mammaires. Des études sur des souris transgéniques ont montré son rôle direct dans la mise en place de la malignité des tumeurs (Slamon DJ *et al.*, 1987 ; Guy CT *et al.*, 1992). Les patients présentant des tumeurs avec ErbB-2/neu activé ont présenté une évolution très agressive avec un pronostic sombre (Paterson MC *et al.*, 1991 ; Andrulis IL *et al.*, 1998).

ErbB-2/neu est apparu comme une cible potentielle dans le développement d'un vaccin anticancéreux car des réponses immunes (anticorps et lymphocyte T) dirigées contre ErbB-2/neu avaient été décrites chez des patients mais à des niveaux trop faibles pour éviter l'évolution tumorale (Disis ML *et al.*, 1996 et Bei R *et al.*, 1999). La mise en place de réponse cellulaire cytotoxique induite par vaccination utilisant des peptides a été décrite dans des modèles animaux (Nagat Y *et al.*, 1997).

Nous appellerons désormais CD/AdNeu_{TK} les cellules dendritiques transduites pour le gène ErbB-2/neu par un vecteur adénoviral.

iii. Transduction des cellules dendritiques ex vivo

Les CD de la moelle osseuse sont préparées comme l'ont décrit Wan Y *et al.* en 1997. Les cellules de la moelle osseuse (*erythrocytes-depleted*) sont collectées puis mises en culture dans un milieu de culture complet complémenté en GM-CSF et IL-4.

Au 2^{ème} jour de culture, les cellules non adhérentes sont mélangées avec précaution et du milieu de culture frais y est ajouté. Elles sont remises en culture pour 3 jours de plus.

Au 5^{ème} jour, les cellules non adhérentes et agrégats sont collectés pour analyses et immunisations. Un panel de marqueurs phénotypiques est utilisé pour caractériser par cytométrie de flux les CD cultivées incluant : CMH-II, B7-2, CD40, et CD11c.

La transduction des CD par les vecteurs adénoviraux est réalisée au 4ème jour. Pour cette étude, les CD ont été transduites par AdNeu_{TK}- (CD/AdNeu_{TK}-), AdmII-12 (CD/AdmII-12), ou AdLacZ (CD/AdLacZ), mises en culture 24h.

Pour finir, les CD transduites sont purifiées au métrizamide puis lavées trois fois au PBS (*phosphate buffered saline*).

iv. Résultats

- **Rôle protecteur des CD/AdNeu_{TK}-**

Afin de déterminer si la réponse immunitaire provoquée par le vaccin que représentent les CD/AdNeu_{TK}- est efficace contre les cellules tumorales exprimant ErbB-2/neu, des souris ont été immunisées par voie sous cutanée (un groupe avec des CD/AdNeu_{TK}- et l'autre avec des CD transduites pour le gène LacZ codant pour la β -galactosidase). Après 14 jours, des cellules NDL (lignée cellulaire tumorale générée sur souris transgéniques surexprimant le gène ErbB-2/neu) sont inoculées à ces souris (Fig 6).

Comme on peut le voir sur la figure 6, les animaux non immunisés (naive) développent des tumeurs 20 jours après l'inoculation alors que 60% des souris immunisées par CD/AdNeu_{TK}- présentent une protection antitumorale pendant toute la durée de l'expérimentation (90 jours). On observe que les souris immunisées avec des CD portant LacZ présentent des tumeurs et que les souris immunisées avec CD/AdNeu_{TK}- ont succombé à une inoculation d'autres lignées tumorales n'exprimant pas ErbB-2/neu, ce qui prouve la spécificité de la réponse à ErbB-/neu.

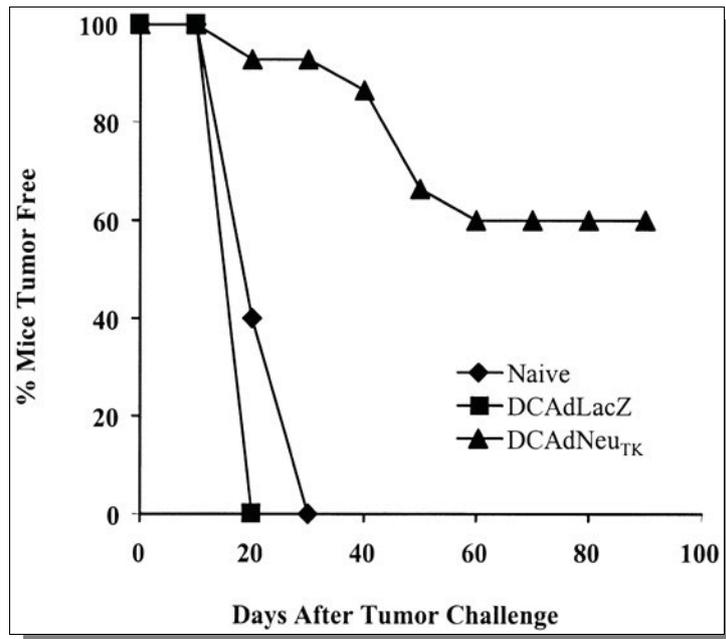


Figure 6 : Induction d'une immunité protectrice par immunisation avec CD/AdNeu_{TK}.

Les souris sont immunisées avec 1.10^6 CD/AdNeu_{TK} ou CD/AdLacZ, puis reçoivent 7.10^6 cellules NDL 14 jours après l'immunisation. Les tumeurs sont mesurées tous les 5 jours pendant 90 jours.

(Chen Y *et al.*, 2001)

- **Implication de cellules T CD4+ et CD8+ dans l'immunité préventive antitumorale**

L'importance des cellules CD4+ et CTL (lymphocytes T cytotoxiques) dans l'immunité antitumorale a été établie dans de nombreuses études. Afin d'explorer l'importance des cellules T CD4+ et CD8+ dans la réponse immunitaire induite par ce vaccin, des épreuves de déplétion sont menées : des anticorps anti-CD4+ et anti-CD8+ ont été injectés à des souris selon deux protocoles.

- a) protocole : des anticorps anti-CD4+ (*GK1.5*) ou anti-CD8+ (*53-6.72*) sont injectés aux souris par voie intra-péritonéale, 2 jours avant l'immunisation par les CD/AdNeu_{TK}, puis tous les 3 jours jusqu'à 14 jours, lorsque les souris sont prêtes pour l'épreuve tumorale (injection de

cellules NDL).

→ **Résultats** : la réduction de chaque type de cellule T CD4+ ou CD8+ pendant la mise en place de l'immunité suivant la vaccination (jours 1 à 14) annule toute réponse immunitaire, ce qui montre l'importance des deux types cellulaires dans l'initiation de la réponse immune, conformément à ce qui avait déjà été étudié (Wan Y *et al.*, 1999 ; Yang S *et al.*, 1999 ; Cao X *et al.*, 1998) (Fig 7. a)

- b) protocole : les anticorps sont administrés 2 jours avant l'épreuve tumorale, puis tous les 3 jours jusqu'à ce que la plupart des souris témoins (souris non immunisées) développent des tumeurs palpables.

→ **Résultats** : seules les cellules T CD8+ sont requises pour rejeter les tumeurs. Ces données confirment les études *in vitro* démontrant que les cellules T CD8+ sont nécessaires pour lyser directement les cellules exprimant l'antigène spécifique et que les CD4+ ont un rôle pré requis dans l'amorçage d'une réponse cellulaire cytotoxique (Fig 7. b).

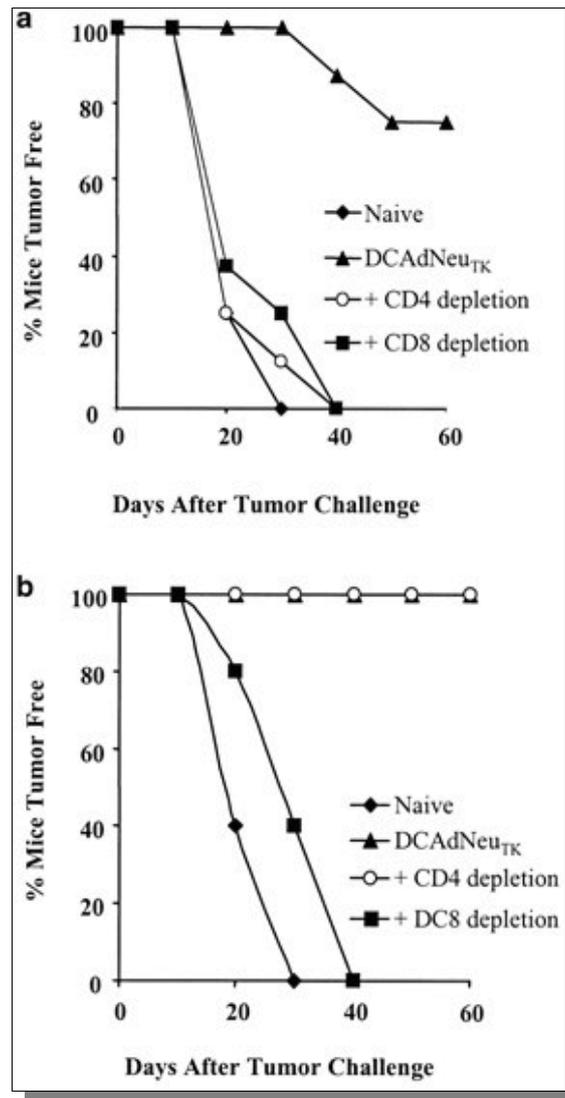


Figure 7 : Déplétion in vivo de cellules T CD4+ et CD8+ au cours de l'immunisation de souris avec CD/AdNeu_{TK} et épreuve tumorale.

(Chen Y *et al.*, 2001)

- Rôle thérapeutique des CD/AdNeu_{TK}.

Afin d'évaluer comment supprimer par la vaccination des tumeurs sous-cutanées établies, des souris porteuses de tumeurs sont traitées par une seule injection de 1.10^6 CD/AdNeu_{TK} ou CD/AdLacZ, 3 jours après l'implantation des tumeurs (Fig 8).

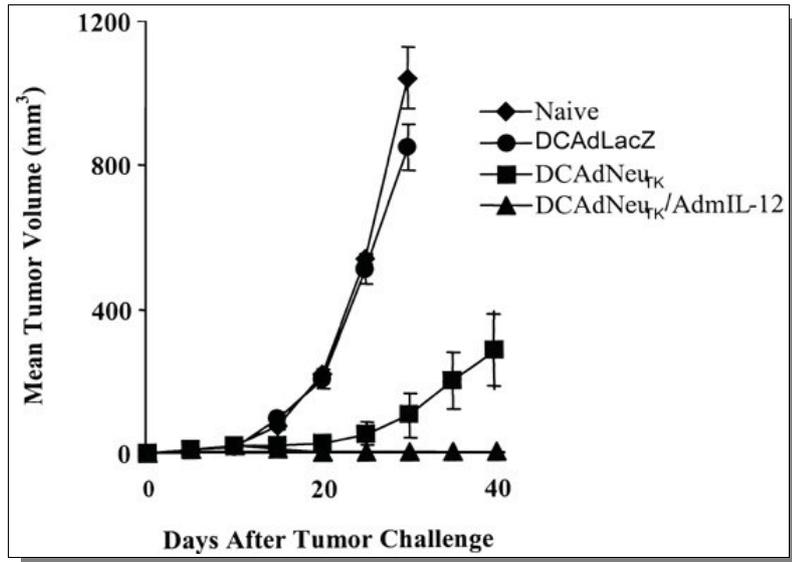


Figure 8 : Suppression de tumeurs sous-cutanées préexistantes par administration de CD/AdNeu_{TK} ou CD/AdNeu_{TK}/AdmIL-12

7.10⁶ cellules tumorales NDL sont injectées aux souris à J0. Trois jours plus tard, chaque groupe, composé de huit souris, est traité avec une seule injection de 1.10⁶ CD/AdNeu_{TK}, CD/AdNeu_{TK}/AdmIL-12, ou CD/AdLacZ respectivement. (Chen Y et al., 2001)

Les souris non immunisées ou immunisées avec CD/AdLacZ présentent de grosses tumeurs 20 jours après l'implantation et ont dû être tuées entre 30 et 40 jours en raison d'un volume tumoral trop important. A contrario, les souris immunisées avec CD/AdNeu_{TK} présentent des tumeurs réduites jusqu'au 40ème jour et 30% des souris traitées ne présentent aucune tumeur à la fin de l'expérimentation.

L'utilisation de CD transduites *in vitro* par un Adénovirus 5 pour le gène ErbB-2/neu a mis en évidence une immunité protectrice et thérapeutique contre des lignées cellulaires tumorales pulmonaires, surexprimant ErbB-2/neu. La co-transduction de ces CD par un Ad5 codant pour IL-12 a accru cette réponse (Chen Y et al., 2001) (Fig 8).

Cette étude soutient l'utilisation de vaccin fondé sur des CD transduites en tant que stratégies thérapeutique et préventive. Elle permet la mise en place de réponses

cellulaires CD4+ et CD8+ antitumorales. L'accent est mis sur la flexibilité du système pour optimiser la réponse immune en combinant présentation de TAA et présence de cytokines d'immunostimulation. Elle semble être une approche prometteuse d'immunothérapie antitumorale pour les cancers humains surexprimant ErbB-2/neu.

c. Autres applications

Ribas A *et al.* ont montré la mise en place d'une réponse immune à cellules T contre un mélanome chez la souris en utilisant des CD transduites, pour le gène MART-1 (= *melan-1*, antigène associé au mélanome), par un adénovirus (Ribas A *et al.*, 2000).

De nombreux groupes de recherche évaluent actuellement l'utilisation de lentivirus dans la transduction de CD dans le cadre d'approches d'immunothérapie antitumorale (Dyall J *et al.*, 2001 ; Esslinger C *et al.*, 2003 ; Lizee G *et al.*, 2004). En effet, les vecteurs lentiviraux sont peu immunogènes, et sont capables de transduire un large éventail de types cellulaires différents. Metharom P *et al.* ont mis en évidence l'induction d'une réponse CD4+ et CD8+ contre des mélanomes faisant intervenir un vecteur lentiviral, selon le même modèle que l'étude précédente. Cette étude présente l'utilisation de CD transduites *ex vivo* par un vecteur issu du VIH-1 afin d'exprimer le transgène mTRP-2 (*murine tyrosinase-related protein 2*) codant pour un antigène associé aux mélanomes (MAA). Une stratégie thérapeutique intéressante contre les mélanomes est démontrée ici, d'autant plus que le stade de la maladie est précoce (Metharom P *et al.*, 2001)

Une autre étude utilisant un amplicon HSV codant le PSA (*prostate-specific antigen*) humain pour transduire des CD *ex vivo* a permis l'immunisation de souris et d'obtenir une réponse cytotoxique spécifiquement dirigée contre des lignées cellulaires tumorales exprimant le PSA (Willis RA *et al.*, 2001).

D'autres vecteurs viraux sont utilisés dans la manipulation génétique *ex vivo* des CD, comme le SFV (virus de la Forêt de Semliki) ou un virus influenza aviaire. Ce

vecteur n'interfère pas avec la fonction de présentation d'antigène, peut être contrôlé par des antiviraux, ne présente pas d'infection persistante et ne s'intègre pas au génome ; autant de propriétés qui en font un bon vecteur potentiel. En effet, un vecteur influenza aviaire a permis l'expression efficace par les CD du TAA MAGE-3 (Strobel I *et al.*, 2000). La transduction de CD par des vecteurs viraux afin de leur faire présenter des TAA et d'induire une réponse immune efficace est une stratégie qui fonctionne dans le domaine expérimental et qui ouvre par conséquent de nombreux espoirs dans la lutte anticancéreuse.

Une autre approche ayant pour stratégie l'induction d'une réponse immunitaire spécifique concerne la transduction de lymphocytes T par des vecteurs viraux.

II. Transduction de lymphocytes T ex vivo

a. Stratégie

Ces vingt dernières années, les progrès en immunothérapie ont permis le développement de thérapies cellulaires pour le traitement de cancers (Rosenberg SA, 1999 ; Blattman JN *et al.*, 2004). Certains patients atteints de mélanomes métastatiques ont présenté une régression objective de leur maladie après avoir reçu des TIL (lymphocytes T infiltrant les tumeurs) autologues, mis en culture *ex vivo* et clonés avant d'être réadministrés aux patients (Rosenberg SA *et al.*, 1986 ; Dudley ME *et al.*, 2005 ; Dudley ME *et al.*, 2002). La limite de cette approche est la nécessité que le patient ait, au préalable, des cellules dirigées contre la tumeur qui puissent être cultivées. De plus, chez de nombreux patients atteints de cancer, en particulier ceux atteints de cancer autre qu'un mélanome, il est très difficile d'identifier ces lymphocytes réactifs. Afin de surmonter ces limites, une nouvelle approche d'immunothérapie a été développée : modifier génétiquement les lymphocytes issus du sang périphérique (*PBLs : peripheral blood lymphocytes*).

Les TAA sont reconnus par les TCR à la surface des lymphocytes T. Les TCR

sont composés de chaînes α et β (Krogsgaard M *et al.*, 2005). Les gènes codant pour les TCR spécifiques de certains TAA ont été identifiés et clonés ; incluant les TCR reconnaissant MART-1 et gp100 (antigènes de mélanome), NY-ESO-1 (antigène de cancer du testicule présent dans de nombreux cancers) et un épitope de la molécule p53, qui est exprimé à la surface de 50% des cancers d'origine épithéliales (Schumacher TN, 2002 ; Sadelain M *et al.*, 2003 ; Zhao Y *et al.*, 2005 ; Morgan RA *et al.*, 2003 ; Hughes MS *et al.*, 2005 ; Cohen CJ *et al.*, 2005). Dans chaque cas, ces antigènes sont reconnus par les TCR lorsqu'ils sont présentés en tant que peptide par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (HLA)-A2.

In vitro, de l'ARN transcrit à partir des quatre TCR reconnaissant les quatre TAA a été électroporté dans des cellules PBL CD8+, qui ensuite ont été mises en culture avec des cellules T2 (CPA modifiées qui ne peuvent pas présenter de peptide endogènes à leur surface) présentant le peptide TAA correspondant. Les cellules transfectées produisent une grande quantité d'IFN γ lorsqu'elles sont en présence de leur peptide respectif et sont capables de reconnaître (HLA)-A2-associé aux tumeurs, incluant le mélanome, le cancer du poumon et du sein (Fig 9).

La stratégie est donc de faire exprimer à des lymphocytes T des récepteurs spécifiques de TAA, afin qu'ils déclenchent une réponse immune contre les cellules porteuses de ces TAA. A l'inverse de l'utilisation de cellules dendritiques modifiées pour qu'elles présentent l'antigène tumoral aux cellules effectrices, il s'agit ici de modifier directement les cellules effectrices pour qu'elles dirigent leur action contre les cellules porteuses de ces antigènes. L'utilisation de vecteurs viraux est possible dans ce cadre et a été étudiée. L'étude suivante emploie un vecteur rétroviral pour transduire les lymphocytes et leur faire exprimer les gènes codant pour les TCR.

Target	Effector RNA				
	GFP	MART-1 TCR	gp100 TCR	NY-ESO-1 TCR	p53 TCR
medium	422	0	0	167	129
T2	146	432	219	168	2,513
Flu	235	537	236	247	4,047
MART-1	272	23,306	186	298	3,305
gp100	192	382	34,801	279	3,483
NY-ESO-1	160	467	192	21,508	3,523
p53	108	453	101	273	>44,198

Figure 9: Sécrétion d'IFN γ par des lymphocytes humains transduits par de l'ARN codant pour la GFP (contrôle), ou les TCR réagissant avec les TAA MART-1, gp100, NY-ESO-1, p53

Les valeurs des IFN γ sont exprimées en pg/ml.
(Morgan RA *et al.*, 2006)

b. Exemple : utilisation d'un rétrovirus pour transduire des lymphocytes T susceptibles d'induire une réponse contre un mélanome

(Dudley ME *et al.*, 2002)

i. Oncorétrovirus et Lentivirus : présentation, avantages et inconvénients de leur utilisation en tant que vecteur

● Retrovirus

Les oncorétrovirus couramment utilisés sont dérivés des oncorétrovirus murins (MLV pour « *Murine Leukemia Virus* ») (Seth P, 2005). Ce sont des particules enveloppées contenant deux molécules identiques d'ARN monocaténaire linéaire de polarité positive, accompagnées d'une transcriptase inverse, mais aussi d'une intégrase et d'une protéase.

Le génome comprend, à ses extrémités, deux régions répétées, dénommées LTR (*Long Terminal Repeat*) qui contiennent les séquences U3, R et U5. Ces régions contiennent le site d'initiation de la transcription, les séquences nécessaires à l'intégration chromosomique et une séquence « activatrice » contenue dans la région U3. Le génome

rétroviral contient, en outre, quatre gènes :

- le gène *gag* codant les protéines de capsid, produites sous forme d'un unique précurseur clivé ensuite en 3 à 5 protéines (matrice, nucléocapside, capsid) ;
- le gène *pol* codant les protéines à activité enzymatique (la transcriptase inverse, une intégrase permettant l'intégration du provirus dans l'ADN cellulaire) ;
- le gène *env* codant une glycoprotéine d'enveloppe qui une fois clivée génère une protéine de surface (SU) et une protéine transmembranaire (TM) ;
- le gène *pro* codant une protéase responsable du clivage des polyprotéines gag, pol et env.

Après pénétration d'un virion dans la cellule cible, l'ARN viral est rétro-transcrit en ADN par l'action de la transcriptase inverse. Cette molécule d'ADN double brin est alors intégrée, de façon aléatoire, dans le génome de la cellule hôte et les gènes peuvent être transcrits par l'utilisation de la machinerie cellulaire (Verma IM *et al.* 2005) (Fig 10).

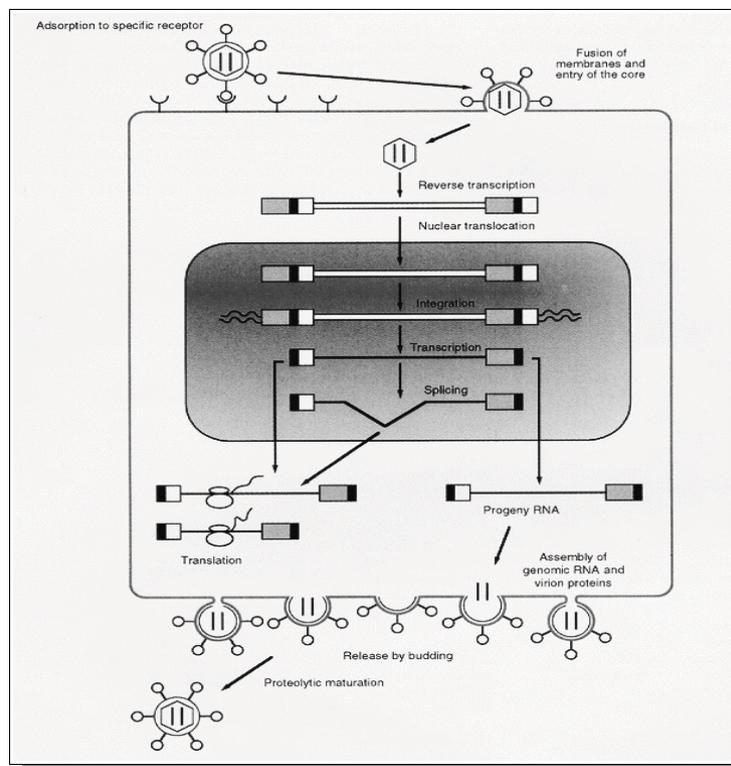


Figure 10 : Cycle de réplication rétroviral (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Une particularité avantageuse des vecteurs rétroviraux est l'absence presque complète de gènes viraux dans le génome transféré. L'expression est donc restreinte à la protéine d'intérêt, ce qui limite la réponse immunitaire développée contre les cellules transduites et augmente ainsi leur persistance (Takeuchi Y *et al.*, 2000). L'intégration du génome viral dans le chromosome de l'hôte permet une expression durable du transgène dans le temps. Cependant l'extinction des promoteurs LTR ou internes par méthylation (Kuriyama S *et al.*, 1998), par effets de cytokines comme l'IFN γ (Qin L *et al.*, 1997) ou par un mécanisme de l'hôte en *cis* (Laker C *et al.*, 1998), est quelque fois observée, limitant ainsi la persistance de l'expression. En outre, l'intégration aléatoire dans le chromosome (au niveau des zones dites de préférence) est accompagnée de l'insertion de promoteurs viraux qui potentiellement pourraient entraîner l'activation ou la dérégulation de proto-oncogènes lors d'application *in vivo* (Donahue RE *et al.*, 1992). Un inconvénient important des vecteurs rétroviraux est la faiblesse des titres obtenus lors de leur production (10^6 à 10^7 unités formant colonies par ml), liée à la faible productivité des lignées de complémentation. Une limitation majeure des rétrovirus (sauf les lentivirus) est liée à leur impossibilité d'infecter des cellules post-mitotiques. En effet, l'intégration ne peut se faire qu'après désorganisation de la membrane nucléaire survenant lors de la mitose (Roe T *et al.*, 1993).

- **Lentivirus**

Les lentivirus possèdent un génome et un cycle de réplication beaucoup plus complexe que les oncorétrovirus classiques (Buchsacher GL Jr *et al.*, 2000). Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) est le lentivirus le plus étudié, responsable du SIDA (« Syndrome d'Immuno-Déficience Acquisée »). Même si la structure organisationnelle du VIH-1 est identique à celle des oncorétrovirus, celui-ci possède des gènes accessoires supplémentaires dont les produits jouent un rôle crucial dans le cycle de réplication (Trono D, 1996). Par exemple, les protéines Tat et Rev sont essentielles pour une expression efficace des gènes viraux. Tat active le promoteur

LTR du VIH et permet la production d'ARN viral (Sodroski J *et al.*, 1985). Rev interagit avec une région de l'ARN viral appelée « *Rev-responsive element* » (rre) et assure ainsi le transport de l'ARN viral du noyau cellulaire vers le cytoplasme (Cochrane AW *et al.*, 1990) (Fig 11).

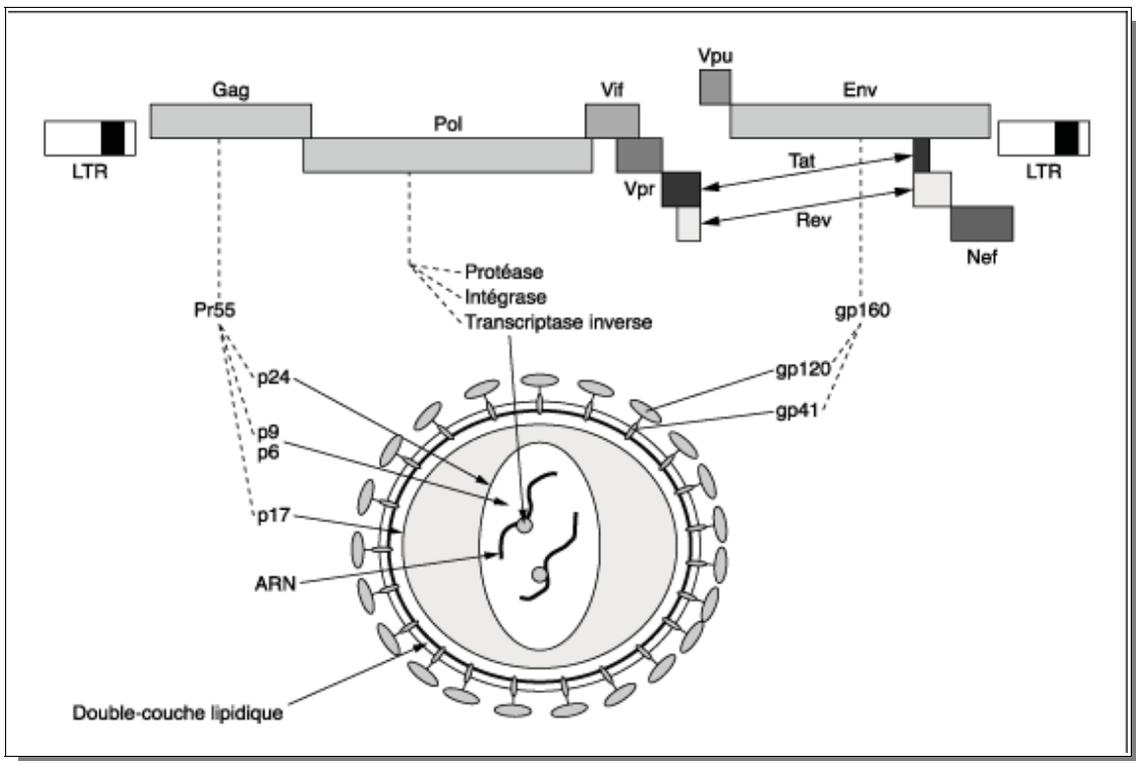


Figure 11 : Structure du génome et de la capside du VIH1

(Paul S *et al.*, 2001)

L'utilisation des vecteurs lentiviraux pour des approches de thérapie génique est surtout motivée par le fait que ces vecteurs peuvent infecter aussi bien des cellules en division que quiescentes (Trono D, 2000).

ii. Le transgène

Dans cet essai clinique de phase I, le transgène correspond aux gènes codant pour les chaînes α et β du TCR anti-MART-1. Ces gènes ont été clonés à partir de clone de TIL obtenu chez un patient atteint de mélanome métastatique qui a présenté une régression quasiment complète après l'administration de TILs (Dudley ME *et al.*,

2002).

iii. Résultats

Un vecteur retroviral a été construit et optimisé pour exprimer les chaînes α et β du TCR anti MART-1 dans des lymphocytes T autologues de patients atteints de cancer métastatique.

- **Efficacité du transfert de gène**

Cette efficacité est évaluée par le repérage de la protéine V β 12 spécifique de ce TCR. Elle est à hauteur de 30% des cellules CD8+ transduites. Environ 15% de ces cellules transduites se lient au complexe HLA-A-MART-1 et sont biologiquement actives c'est-à-dire qu'elles sécrètent de grandes quantités d'IFN γ lorsqu'elles sont mises en culture avec des cellules présentant MART-1 et des cellules de mélanome.

- **Efficacité *in vivo* de ces cellules T porteuses du TCR anti-MART-1**

Elle est évaluée en choisissant 17 patients atteints de mélanome métastatique évolutif pour tester ce traitement. Pour tous, leur cancer était réfractaire au traitement aux IL-2. Chaque culture cellulaire après transduction a donné des cellules T biologiquement actives, le transfert de gène ayant été efficace à hauteur de 42% en moyenne. Les patients ont reçu leur PBLs autologues transduits pour les gènes codant le TCR anti-MART-1 au moment où la lymphopénie est maximale.

L'étude a divisé les patients en trois cohortes différentes selon le mode de culture des lymphocytes. Trois patients appartenant à la première cohorte ont été traités avec des cellules ayant crû pendant 19 jours et doublé leur population entre 8,7 et 11,9 jours. Pour ces patients, moins de 10% des cellules transduites ont persisté jusque 30 jours après la réinjection des LT, et moins de 2% de ces cellules ont persisté au delà de 50 jours. Les patients de cette cohorte n'ont présenté aucun retard dans la progression de la maladie.

Dans le but d'administrer des LT modifiés, qui soient dans leur phase de croissance, les conditions de culture ont été modifiées afin de limiter la période de culture *ex vivo* entre 6 et 9 jours après leur stimulation. Ainsi, les patients de la cohorte 2 reçoivent des cellules qui ont doublé leur population en 2 jours. Les patients de la cohorte 3 ont reçu des cellules en division obtenues selon un protocole de croissance après 8 à 9 jours (cellule doublant leur population entre 0,9 et 3,3 jours). Contrairement au peu de persistance des cellules chez les patients de la cohorte 1, les patients des cohortes 2 et 3 présentent tous une persistance supérieure à 9% une semaine et 4 semaines après le traitement (de 9 à 56%).

Les 8 patients ayant fourni des échantillons après 50 jours, présentaient une persistance de plus de 17%, et ce au delà de 90 jours pour 7 patients. Chez un patient, 60% de ses lymphocytes T circulant étaient porteurs du transgène. Des RT-PCR ont été effectuées un mois après le traitement chez 14 patients, mettant en évidence que l'expression du transgène continuait. Pour 14 patients les quantités de cellules CD8+ portant VB12 ont augmenté une semaine après le traitement ; et pour 11 patients, un mois après, leur quantité était plus élevée qu'avant le traitement. Sur 13 patients examinés, tous présentent une augmentation des cellules porteuses de tétramères se fixant à MART-1.

Cependant, il existe une discordance entre la persistance moyenne des cellules transduites à un mois pour les cohortes 2 et 3 (26%) et la quantité de cellules exprimant VB12 (8,1%) et les cellules se fixant à MART-1 (0,8%). Cette discordance peut être due, en partie, à un défaut d'appariement entre les chaînes du TCR introduites avec les chaînes endogènes ou attribuée aux différentes sensibilités des essais. L'expression réduite du transgène dans les cellules persistantes au delà d' un mois peut être due à la diminution de la transcription du transgène rétroviral et le déclin métabolique observé lors de la conversion des cellules en cellules mémoires. Cette diminution d'expression du transgène pourrait avoir une incidence sur la mesure des tétramères qui repose sur l'agglutination de multiples récepteurs.

Ce qui paraît le plus important est que deux patients ont montré une régression

constante de leur mélanome métastatique. Le patient 4, un homme de 52 ans, avait reçu au préalable un traitement à l'IFN α , une ablation d'un nœud lymphatique, un vaccin expérimental, des doses massives d'IL-2. Le patient avait développé par la suite, des masses, d'une part sur le foie (masse de 4,4 sur 3,3cm) et sur un nœud lymphatique axillaire d'autre part (1,3 sur 1,2cm). Après le traitement avec les LT modifiés, le patient a connu une régression complète de la masse axillaire et une réduction de 89% de la masse hépatique, qui a pu être retirée chirurgicalement. Depuis, 3ans après le traitement, il demeure cliniquement sain (Fig 12. A,B).

Le patient 14, un homme âgé de 30 ans, avait reçu un traitement consistant en une exérèse de nœud lymphatique, IFN α et de hautes dose d'IL-2. Il développe par la suite, une masse de 4cm sur 2,5cm dans le hile pulmonaire. Après le traitement aux LT transduits, il présente une régression de la masse et reste sain 3 ans plus tard (Fig 12. C,D).

Ainsi, deux patients avec un mélanome métastatique évoluant rapidement ont montré une régression complète de la maladie après modification génétique de leurs propres lymphocytes T faisant intervenir des vecteurs viraux.

Des approches sont à l'étude dans le but d'augmenter l'expression du transgène et son utilisation, incluant l'utilisation de vecteur lentiviral, l'utilisation de promoteurs plus puissants spécifiques des cellules T, la production de titres viraux plus importants. La modification des régions constantes des TCR pourrait prévenir le défaut d'appariement rencontré dans cette étude (Cohen CJ, *et al.* 2006), ou encore la modification génétique de cellules souches hématopoïétiques (Yang L *et al.*, 2005).

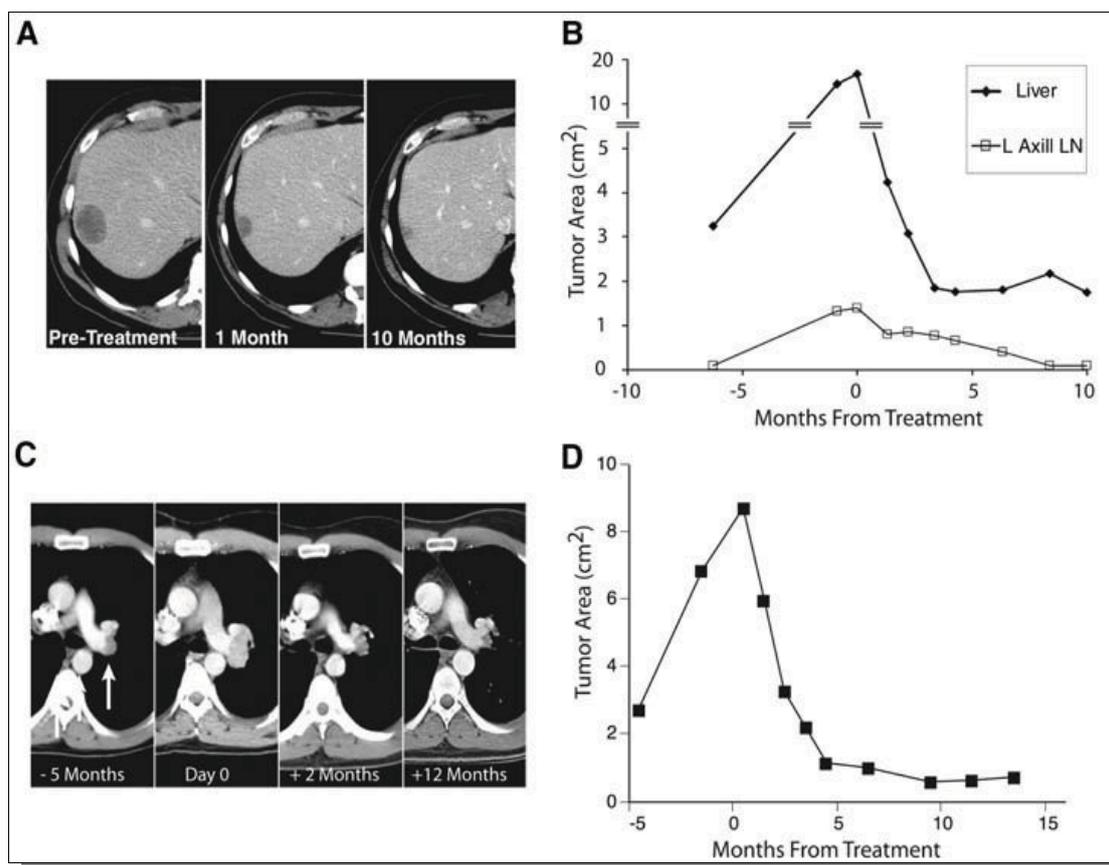


Figure 12 : Régression cancéreuse chez deux patients

A. Images métastase hépatique chez le patient 4 avant le traitement, 1 mois et 10 mois après le traitement.

B. Evolution des tailles des tumeurs axillaire et hépatique chez le patient 4. J0=début du traitement.

C. Images du nœud lymphatique hilare métastasé chez le patient 14 avant traitement, J0, 2 mois et 12 mois après traitement.

D. Evolution de la taille de la tumeur chez le patient 14.

(Morgan RA et al., 2006)

Ainsi cet essai clinique a démontré que chez des sujets humains souffrant de cancer, il est possible de réinjecter des lymphocytes T autologues, transduits *ex vivo* pour le gène codant un TCR anti-TAA, qui peuvent persister et exprimer le transgène pendant un temps prolongé *in vivo*. De plus une régression durable de tumeurs importantes a été observée.

Même si la proportion de réponses (16%) est plus faible que celles causées par la multiplication *ex vivo* de TILs autologues (50%), cette méthode demeure intéressante

pour les patient n'ayant pas de TILs disponibles.

c. Autres applications

La construction de PBLs tels qu'ils expriment des TCR reconnaissant NY-ESO-1 ou l'antigène p53 permet la reconnaissance *in vitro* de TAA exprimés par des cancers courants et l'utilisation de ces cellules modifiées génétiquement méritent d'être évaluées pour le traitement de patients.

Une étude a mis en évidence la possibilité de cibler l'activité des macrophages envers des cellules tumorales en faisant intervenir un vecteur poxviral (MVA : Modified Vaccinia Ankara) recombinant codant pour un anticorps spécifique de tumeur anti-MUC-1 (Paul S *et al.*, 2000).

Ainsi, les vecteurs viraux sont largement à l'étude en immunothérapie afin de transduire *ex vivo* des cellules de l'immunité ; de façon très majoritaire, il s'agit de la modification génétique de cellules dendritiques. Celles-ci sont réinjectées afin d'induire une réponse immunitaire spécifique. Une autre stratégie consiste en l'administration directe de vecteurs viraux, *in vivo*.

III. Injection directe systémique de vecteurs pour induire une réponse spécifique

a. Stratégie

Les vecteurs viraux ont la capacité à mimer une infection naturelle et ainsi provoquent potentiellement un signal de danger, ce qui oriente la réponse immunitaire vers une réponse à médiation cellulaire (Th1) souhaitée. De plus, ils ont été présentés comme de bons adjuvants, comme dans l'étude de Geutskens SB *et al.* qui a démontré l'activité adjuvante d'un vecteur adénoviral dans un modèle murin de métastases hépatiques d'un cancer colorectal (Geutskens SB *et al.*, 2000). Ce qui en fait de bons systèmes pour délivrer des antigènes *in situ*. Dans ce contexte, il est nécessaire d'avoir

une expression du gène courte mais importante pour une vaccination optimale.

Les vecteurs dérivés du SFV ont montré d'immenses promesses pour les stratégies de vaccination dans différents modèles de cancer (Atkins GJ *et al.*, 2004) ; en effet, ils induisent une expression élevée du transgène et 48-72 heures après l'expression du transgène, les cellules infectées meurent par apoptose. De plus, les corps apoptotiques résultants sont riches en produits du transgène : ainsi ils permettent une activation de la réponse immunitaire innée et adaptative. On peut noter que l'homme n'a généralement pas d'anticorps neutralisants préexistants contre ces virus.

Les vecteurs dérivés des adénovirus ont aussi montré un potentiel dans les stratégies d'immunothérapie pour le traitement du cancer du col de l'utérus dans les études animales. Une étude de Gomez-Gutierrez JG *et al.* a présenté l'immunisation d'une souris avec un adénovirus porteur du gène codant la protéine oncogène E7 du papillomavirus à haut risque 16 (HPV16), lié au gène de la calreticulin (Gomez-Gutierrez JG *et al.*, 2006). La calreticulin permet d'améliorer la présentation de peptides par les molécules du CMH-1. Cette immunisation s'est avérée efficace dans la prévention de la croissance de tumeurs exprimant E7, ainsi que dans l'élimination de tumeurs établies avec une mémoire immunitaire à long terme.

b. Exemple : injection directe d'un vecteur lentiviral induisant une immunité antitumorale dans un modèle murin

Dullaers *et al.* ont étudié l'utilisation d'un vecteur lentiviral par injection directe *in vivo* (Dullaers *et al.*, 2006).

Cette étude décrit l'utilisation de vecteurs lentiviraux pour transduire *in vivo* des CD chez des souris C57BL/6. L'ovalbumine (OVA) représente l'antigène modèle, par conséquent les vecteurs lentiviraux sont porteur du transgène OVA. De nombreux paramètres de la réponse immunitaire suivant l'injection directe de vecteurs sont mis en évidence. De plus un effet thérapeutique est également décrit contre des tumeurs MO-4 après l'administration des vecteurs.

- La détection d'ARNm codant pour OVA dans les nœuds lymphatiques drainant la zone prouve l'efficacité de la transduction

L'évaluation de cette transduction est effectuée en prélevant des nœuds lymphatiques à différents moments suivant l'injection directe des vecteurs viraux, suivi de RT-PCR. La RT-PCR montre que le transgène est présent en quantité importante 2 jours après l'injection et encore détectable au 10ème jour. Après 25 jours, le transgène OVA n'est plus détectable (Fig 13).

Pour comparer ; la même évaluation avait été menée pour des CD transduites *ex vivo* : la présence de OVA n'était détectable que durant une semaine après l'injection des CD transduites (Dullaers M *et al.*, 2004).

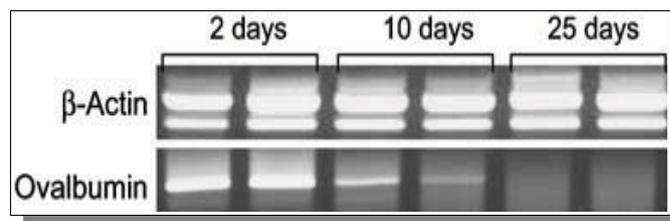


Figure 13 : Détection par RT-PCR de OVA dans les nœuds lymphatiques drainants après l'injection directe de vecteurs lentiviraux

(Dullaers M *et al.*, 2004)

- L'activité cytotoxique des CTL induite par l'administration directe des vecteurs lentiviraux est similaire à celle induite par des CD transduites *ex vivo*

L'évaluation de l'activité cytotoxique se fait par prélèvement de nœuds lymphatiques 7 jours après l'immunisation, d'une part par des CD transduites *in vitro* et par des vecteurs lentiviraux administrés *in vivo*. Après 5 jours, les nœuds lymphatiques sont stimulés *in vitro* par des cellules tumorales EG7-OVA (cellule

murine de thymome exprimant OVA) et EL4 (cellules tumorales syngéniques). Les CD transduites *ex vivo* induisent la lyse de $52.0 \pm 6\%$ de cellules EG7-OVA contre $45.9 \pm 8\%$ pour les vecteurs administrés directement ce qui représente une différence non significative d'un point de vue statistique (Fig 14). Notons qu'un plus grand nombre de cellules ont été trouvées dans les nœuds lymphatiques isolés de souris immunisées directement par les lentivirus que dans ceux issus des souris immunisées pas les CD transduites *ex vivo*. Cela suggère que l'injection directe *in vivo* de vecteur lentiviral active plus de cellules T que l'injection de CD transduites *ex vivo*.

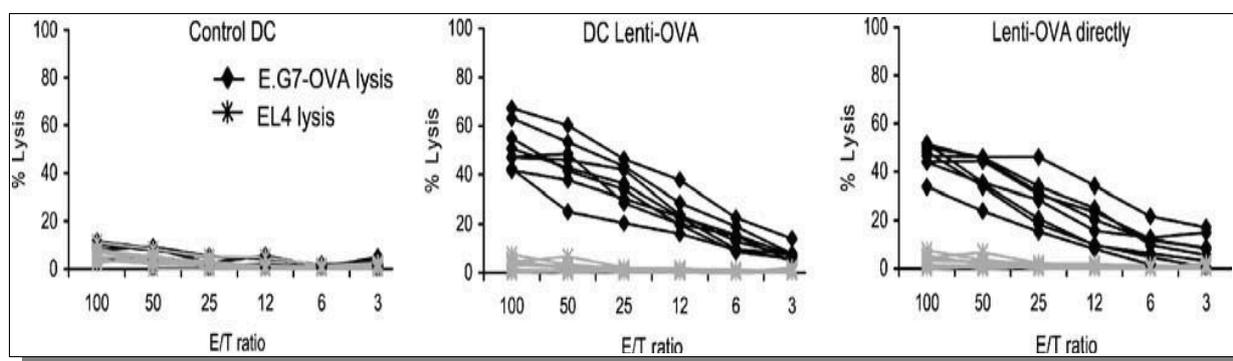


Figure 14 : Activité cytolytique in vitro

Les souris sont immunisées avec 1.10^5 CD transduites *ex vivo* ou 2.10^7 TU de lenti-OVA. Sept jours plus tard, les cellules de NL sont isolées et restimulées avec EG7-OVA. La lyse des cellules EL4 et EG7-OVA induite par les CTL est montrée ici.

(Dullaers M *et al.*, 2004)

- **L'injection directe de vecteurs lentiviraux induit une quantité importante de cellules productrices d'interféron- γ**

Il s'agit de voir le nombre de cellules T activées après l'injection de lentivirus ou CD. Cette évaluation se fait sur cellules de rate grâce à une épreuve *in vitro* qui fait intervenir un anticorps couplé à une enzyme qui se lie aux interférons- γ (ELISPOT). Une semaine après l'immunisation (par CD ou vecteur lentiviral) sont quantifiées les cellules T spécifiques de OVA productrices d'interféron- γ . Les résultats montrent que l'injection directe de vecteur lentiviral active plus les cellules T spécifiques de OVA (Fig 15).

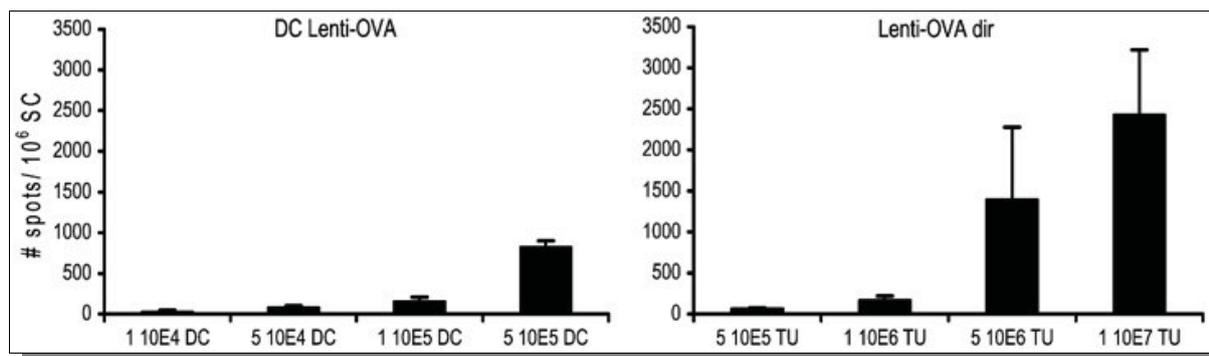


Figure 15 : Quantification par ELISPOT de cellules T spécifiques produisant de l'IFN γ

(Dullaers M *et al.*, 2004)

- **Directement après l'administration : une puissante activité cytotoxique est mise en évidence *in vivo***

L'activité cytotoxique et l'induction d'un grand nombre de cellules T spécifiques de l'OVA produisant des interféron- γ ont été montrés *in vitro*. Ici, c'est l'activité cytotoxique *in vivo* envers les cellules exprimant OVA qui est démontrée.

- **Mise en place d'une mémoire CTL après l'injection**

Il est important, lors de la mise en place d'une immunité, que des cellules mémoires apparaissent pour prévenir d'éventuelles rechutes. Si une mémoire immunitaire est présente, une deuxième exposition à l'antigène doit induire une réponse plus rapide et plus efficace. Cette mémoire est mise en évidence en testant l'activité cytolytique 7 jours après l'immunisation de rappel (150 jours après la première immunisation).

- **L'administration directe *in vivo* de vecteurs lentiviraux active une réponse de type 1 à cellules T CD4+**

Les lymphocytes T *helpers* CD4+ jouent un rôle important dans la mise en place de la réponse immunitaire antitumorale et de la mémoire immune.

Les résultats suggèrent que l'administration directe de vecteurs lentiviral ou

l'injection de CD transduites *ex vivo* induisent une réponse immunitaire orienté Th1, ce qui est favorable dans le cadre de l'immunothérapie antitumorale.

- **L'amorçage de la réponse et la mise en place de la mémoire immunitaire sont totalement dépendants des CD4+ dans le cadre de l'immunisation par des CD transduites *ex vivo* mais seulement partiellement après l'injection directe de vecteurs lentiviraux**

Contrairement aux administrations de CD transduites *ex vivo*, l'injection directe de vecteurs lentiviraux ne nécessite pas de cellules T CD4+ pour l'induction de la réponse immunitaire cytotoxique. En revanche, ils sont nécessaires pour la mise en place de la mémoire immunitaire.

- **Une immunité thérapeutique est induite par l'administration *in vivo* de vecteurs lentiviraux**

Il s'agit d'étudier dans quelle mesure cette immunité peut diminuer la croissance de tumeurs exprimant OVA pré-existantes. Des souris se sont vues inoculer des doses massives de cellules MO-4, puis immunisées par la suite aux jours 3, 10 et 17. Le suivi de la croissance tumorale et de la survie des souris se fait pendant 60 jours, à partir de l'injection des cellules tumorales.

Des tumeurs se développent sur les souris non immunisées, et parviennent toutes à une taille rédhibitoire de 15mm de diamètre entre le 10^{ème} et 20^{ème} jour.

Pour la plupart des souris immunisées, de petites tumeurs sont palpables au 17^{ème} jour (=jour de la 3^{ème} immunisation).

Les souris immunisées avec la petite dose (1.10^5) de CD transduites *ex vivo* sont exclues au jour 38 (même critère : diamètre de la tumeur atteignant 15mm). Cette différence d'espérance de vie est significativement différente des souris non immunisées ($p=0,013$).

Les souris immunisées avec une dose plus importante (5.10^5) de CD transduites *ex vivo* sont exclues 10 jours plus tard ($p=0,009$).

Les deux groupes de souris immunisées par injection directe de vecteurs (2.10^6 TU et 1.10^7 TU Lenti-OVA) ont présenté une survie prolongée significative par rapport aux souris naïves ($p<0,001$). Toutes les souris du groupe 2.10^6 TU ont été tuées vers le 45^{ème} jour. Par contre, quelques souris du groupe 1.10^7 TU ont survécu à l'épreuve tumorale. Un animal survivant a été testé 250 jours après cette épreuve tumorale et présentait encore une activité CTL avec 29% de lyse des cellules présentant OVA.

D'autres études ont montré la mise en place de réponses CTL contre des antigènes de tumeurs associés au mélanome MART-1 (Esslinger C *et al.*, 2003), MAGE-3, tyrosinase, gp100 (Firat H *et al.*, 2002) et Ny-ESO (Palmowski MJ *et al.*, 2004) après injection directe de vecteur lentiviral chez des souris transgéniques HLA-A2. Cette méthode puissante mérite donc de continuer à être étudiée dans le cadre de stratégies antitumorales.

c. Limites et perspectives

L'administration systémique de vecteurs viraux en est encore à ses balbutiements, les travaux actuels cherchent à développer un vecteur qui ne soit pas dangereux et efficace pour l'utilisation de cette voie. L'administration systémique se révélait jusqu'alors inefficace à cause d'une circulation insuffisante du vecteur suite à leur neutralisation, d'adhésions non-spécifiques et de concentrations insuffisantes au niveau des aires concernées.

Les études actuelles tendent à surmonter les limites posées par le système immunitaire et par les vecteurs eux-mêmes.

i. Déjouer le système immunitaire pour faciliter l'administration systémique

La limite majeure dans l'utilisation de vecteurs viraux dans l'immunothérapie antitumorale par voie systémique est l'inactivation du vecteur délivré par la même réponse immunitaire qui cible le virus sauvage. Quelques approches ont été

développées pour surmonter ces problèmes.

Les vecteurs adénoviraux ont beaucoup été utilisés dans l'immunothérapie antitumorale, car ils sont faciles à produire, peuvent infecter de nombreux hôtes, des cellules en division ou non (Li Q *et al.*, 1993 ; Quantin B *et al.*, 1992), et peuvent être manipulés génétiquement relativement facilement. Cependant ils représentent les vecteurs les plus immunogènes et induisent une importante réponse immune cellulaire et humorale (Raper SE *et al.*, 2003 ; Raper SE *et al.*, 2002). La réponse humorale implique la sécrétion d'anticorps dirigés contre les vecteurs adénoviraux, ce qui engendre leur élimination pendant que la réponse cellulaire active les cellules T cytotoxiques, macrophages et NK, ce qui provoque la destruction des cellules infectées pas les vecteurs. C'est pourquoi un vecteur adénoviral « déboyauté » (« gutless ») a été développé. Ce vecteur est dépourvu de presque tous ses gènes viraux, sont conservées les séquences ITRs et le signal packaging. Ce vecteur est dépendant de virus auxiliaire qui apporte en *trans* les protéines nécessaires à la réplication et à l'assemblage des particules virales. Ce vecteur est beaucoup moins immunogène et persiste plus longtemps chez l'hôte (Kochanek S *et al.*, 1996 ; Kochanek S *et al.*, 2001 ; Parks RJ *et al.*, 1996).

Des antigènes du virus sauvage peuvent être reconnus par le système immunitaire et engendrer une réponse antivirale, c'est pourquoi la stratégie d'enveloppement (par encapsulation ou par conjugaison de la capsidie avec une substance protectrice) du vecteur viral se développe. Ces stratégies ont principalement été développées pour les vecteurs adénoviraux, étant les plus immunogènes, mais ont aussi été étudiées pour les AAV (Le HT *et al.*, 2005). Concernant les vecteurs adénoviraux, il s'agit d'enveloppement du vecteur avec un liposome cationique (Yotnda P *et al.*, 2002) ou de conjuguer du polyéthylène glycol (PEG) sur la capsidie virale (Croyle MA *et al.*, 2001 ; Croyle MA *et al.*, 2002 ; Croyle MA *et al.*, 2005 ; Mok H *et al.*, 2005) ; nous développerons ces aspects ultérieurement.

ii. Des vecteurs ciblant pour augmenter l'efficacité de l'administration systémique et la sécurité

Le succès de la thérapie génique réside dans l'expression optimale du gène

thérapeutique et une méthode de délivrance de l'ADN appropriée. L'administration systémique, par exemple, par voie intraveineuse permettrait d'atteindre de profondes tumeurs ou des métastases indétectables. Mais pour des raisons évidentes de sécurité, il serait préférable que l'expression du transgène se limite aux cellules cibles. Nous développerons cet aspect incontournable dans la 3ème partie, lors de l'utilisation de vecteurs viraux oncolytiques.

IV. Exemple de l'utilisation du virus de la vaccine dans la lutte contre les cancers anogénitaux (ou l'utilisation de vecteur codant pour des TAA ayant pour origine un virus inducteur de tumeur)

Le cancer du col de l'utérus est le deuxième cancer, par ordre d'importance, chez la femme dans le monde. Les papillomavirus sont des virus qui infectent les muqueuses ou les épithéliums kératinisés. Il existe de très nombreux génotypes de papillomavirus humains ; certains de ces génotypes sont actuellement considérés comme les agents étiologiques du cancer invasif du col de l'utérus et des dysplasies intra-épithéliales de haut grade qui le précèdent (IARC, 1995). Les papillomavirus de types 16, 18, 45, 33 et 31 sont souvent associés aux dysplasies cervicales de haut grade et sont retrouvés dans 84% de tous les cancers génitaux associés aux papillomavirus. Les génotypes 6 et 11 sont les plus fréquemment observés dans les verrues anogénitales. Cette association et la fréquence de ces infections justifient le développement de vaccins pour prévenir les infections à papillomavirus génitaux ou pour induire une régression des lésions néoplasiques induites par ces virus. En ce qui concerne la prévention, GARDASIL est un vaccin recombinant quadrivalent contre les types 6, 11, 16 et 18, commercialisé par Sanofi Pasteur MSD depuis septembre 2006. CERVARIX est un vaccin bivalent contre les types 16 et 18 commercialisé depuis septembre 2007 par GSK (GlaxoSmithKline). Ce qui nous intéresse présentement est l'utilisation de vecteurs viraux dans le développement de thérapies anticancéreuses.

a. Les papillomavirus : des virus inducteurs de cancers

Les papillomavirus sont des petits virus à ADN, non enveloppés, à symétrie icosaédrique d'un diamètre variant de 52 à 55 nm. Ils possèdent une molécule d'ADN double brin circulaire d'environ 8000 pb.

Le génome code d'une part, pour les protéines précoces E (E1 à E7 *early*), qui assurent la réplication de l'ADN viral et la régulation de l'expression des gènes viraux et pour des protéines tardives L (L1 et L2 *late*), qui sont des protéines de structure. Le profil de la transcription des gènes change en fonction de l'état de la différenciation des cellules infectées. Les gènes précoces sont peu exprimés dans les couches basales des lésions condylomateuses ou des dysplasies légères, et les transcrits E6 et E7 sont absents dans les cellules différenciées, alors que les transcrits E4 et L1 sont présents dans les cellules des couches supérieures de l'épithélium. Il faut noter que dans les cancers, les transcrits E6 et E7 sont très nombreux dans tout l'épithélium alors que les transcrits L1 et L2 sont absents. Les protéines E6 et E7 sont des oncoprotéines qui sont impliquées dans le processus tumoral des cellules infectées (Howley P, 1996). La protéine E6 semble fonctionner en s'associant avec des protéines cellulaires, et notamment la protéine p53. Cette association entraînerait la dégradation de la p53 et par conséquent la poursuite du cycle cellulaire. Les papillomavirus à haut risque de cancérisation se distingueraient des autres en partie par une différence d'affinité de la protéine E6 pour la p53. La protéine E7 coopère avec la protéine E6 pour immortaliser les cellules infectées par le papillomavirus. Elle possède la capacité à se fixer sur la protéine suppresseur de tumeur du rétinoblastome, pRb, qui est impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire.

Chez la plupart des individus atteints, l'infection par les papillomavirus ne semble pas conduire à des signes cliniques. Les modifications morphologiques qui s'observent au niveau du col pendant une infection non persistante sont du type CIN I (dysplasies intra-épithéliales de bas grade). La plupart de ces lésions régressent spontanément, mais pour une faible proportion de sujets (0-15%), l'infection devient chronique et progresse vers des lésions de haut grade (CIN II et III), voire un cancer invasif. Les infections chez les jeunes sujets sont transitoires la plupart du temps, alors que chez les sujets âgés, elles sont chroniques. Seules les femmes avec des

infections persistantes associées à des papillomavirus humains (PVH) à haut risque ont des lésions qui progressent vers un grade supérieur ou un cancer invasif, alors que les femmes ayant une cytologie anormale associée à des infections de bas grade ont des lésions qui ne progressent pas (Remmink AJ *et al.*, 1995).

b. Virus de la vaccine et vaccination thérapeutique dans les cancers induits par les PVH

i. Virus de la vaccine : présentation

Le virus de la vaccine appartient à la famille des *Poxviridae*, groupe de virus caractérisé par un grand génome à ADN, par une réplication dans le cytoplasme de la cellule infectée, et par une expression de ses propres enzymes nécessaires à la réplication et la transcription de l'ADN (Smith GL et Vanderplasschen A, 1998). La famille des *Poxviridae* est divisée en deux sous-familles, les *Chordopoxviridae* et les *Entomopoxviridae*. La sous-famille des *Chordopoxviridae* est elle-même divisée en plusieurs genres fondés sur la spécificité d'infection, l'antigénicité et les similarités génomiques. Le genre des *Orthopoxvirus*, auquel est rattaché le virus de la vaccine, est spécifique des vertébrés et comprend les poxvirus les plus étudiés. A noter que le virus de la vaccine est le seul virus à avoir permis l'éradication totale d'une maladie humaine, la variole. Néanmoins, l'origine du virus et son hôte naturel restent encore inconnus (Alcami A *et al.*, 1996). Quand Edward Jenner, un médecin anglais, a prélevé un échantillon d'une lésion chez une personne atteinte d'une infection cutanée contractée au contact d'une vache, il a estimé que le matériel prélevé était issu de la vache et l'a communément appelé « cowpox ». Ce matériel a été utilisé par Jenner en 1796 pour vacciner un enfant contre la variole puis le vaccin a été entretenu initialement par transmission de personne à personne avant d'être cultivé sur la peau scarifiée de bovins. Dans les années 30, il a été observé que la souche utilisée pour vacciner contre la variole était bien distincte de la souche de cowpox connue. Différentes modifications dues à divers passages dans des conditions artificielles ont provoqué la naissance d'un virus éteint dans la nature, le virus de la vaccine (Baxby D, 1999 ; Hermiston TW *et al.*, 2002). D'autres travaux suggèrent que le virus de la vaccine proviendrait des équidés (Alcami A *et al.*, 1996).

Le génome du virus de la vaccine (VacV) est une molécule linéaire double brin qui a été entièrement séquencée (192 kpb) et contient approximativement 200 gènes (Shchelkunov SN, 1995). Comme beaucoup d'autres virus, le VacV possède des ITR identiques mais dont l'orientation est opposée. Les gènes situés au milieu du génome sont généralement importants pour la réplication et l'expression du génome viral et la formation des virions. Ils codent les enzymes nécessaires à la réplication et à la transcription de l'ADN ainsi que les protéines de structure (Moss B, 1991). Les gènes placés dans les régions terminales du génome sont, quant à eux, le plus souvent non essentiels à la réplication virale (i.e. les gènes codant les protéines de restriction d'hôte ou nécessaires à la virulence). Ainsi, ces régions codent des protéines interférant avec des éléments essentiels à la réponse de l'hôte à l'infection virale tels que le complément, les interférons, les constituants de la réponse inflammatoire, l'apoptose, les cytokines, les chimiokines et la synthèse de stéroïdes (Smith GL, 1999).

ii. La réplication poxvirale

Une réplication localisée exclusivement dans le cytoplasme a été décrite uniquement pour les poxvirus et le virus de la peste porcine africaine. Des foyers de réplication cytoplasmiques, appelés viroplasmes, ont été découverts par autoradiographie et grâce à des procédures microscopiques (Cairns J, 1960).

Le VacV code de nombreuses enzymes impliquées dans le métabolisme des désoxyribonucléotides de manière à augmenter le niveau de précurseurs nécessaires au processus de réplication de l'ADN viral dans la cellule. Les principales enzymes sont la thymidine kinase (Hruby DE *et al.*, 1982), la thymidylate synthétase (Smith GL *et al.*, 1989), la ribonucléotide réductase (Tengelsen LA *et al.*, 1988) et la dUTPase (Broyles SS, 1991).

La durée de la synthèse d'ADN varie suivant les différents membres de la famille des *Poxviridae* et dépend de la multiplicité d'infection et du type de cellules infectées. Dans des cellules synchronisées infectées par le VacV, la réplication de l'ADN commence une à deux heures après l'infection et permet la génération d'environ 10 000 copies de génome par cellule dont environ la moitié donne lieu à des virions correctement assemblés (Joklik WK *et al.*, 1964). Quelques études ont indiqué que la réplication des VacV commence à chaque extrémité du génome avec l'introduction de

coupures simple brin (Pogo BG *et al.*, 1981) et suggère un mécanisme de déplacement du brin et l'existence de petits fragments d'ADN liés de manière covalente à des amorces d'ARN (Esteban M et Holowczak JA, 1977 (a,b,c)). Cependant, ces premières observations n'ont pas été confirmées par des techniques récentes. Étrangement, aucun plasmide circulaire ne peut se répliquer dans des cellules infectées par un VacV (Merchinsky M *et al.*, 1988). Ceci suggère que le VacV ne possède pas de séquence spécifique d'origine de répllication et utilise un nouveau mécanisme de répllication. De plus, la répllication du génome des poxvirus implique la formation de concatémères intermédiaires (Moss B *et al.*, 1983).

Au sein de la nucléocapside virale, un pool d'environ 100 ARNm est transcrit, facilité par la machinerie virale de transcription précoce, assemblée lors de la formation du virion (Holowczak JA *et al.*, 1972). Les ARNm précoces sont conduits de la nucléocapside, contenant le génome, vers le cytoplasme pour être traduits. La synthèse des protéines précoces du VacV est nécessaire pour au moins deux étapes importantes : la décapsidation définitive du virus qui libère l'ADN parental et la répllication de l'ADN (Sarov I *et al.*, 1972).

Le cycle viral est divisé en trois phases dites précoces, intermédiaires et tardives. Les gènes précoces sont immédiatement exprimés après l'entrée du virus dans la cellule et l'exposition de la nucléocapside virale dans le cytoplasme, alors que les gènes intermédiaires et tardifs le sont après le début de la répllication de l'ADN. Les gènes précoces codent des protéines intervenant dans la décapsidation, des enzymes du métabolisme des nucléosides et de la répllication de l'ADN, des facteurs transcriptionnels intervenant dans les phases intermédiaires et tardives ainsi que des facteurs de virulence dont certains sont sécrétés hors de la cellule afin d'interférer avec la réponse de l'hôte (Doms RW *et al.*, 1990). Les gènes de la phase intermédiaire codent des facteurs nécessaires pour la transcription des messagers tardifs. Les gènes tardifs sont exprimés lorsque les facteurs de transcription tardifs sont disponibles. Ils codent des protéines de structure du virus, les enzymes contenues par les particules virales nécessaires à la phase précoce, et certains facteurs de virulence (Fig 16).

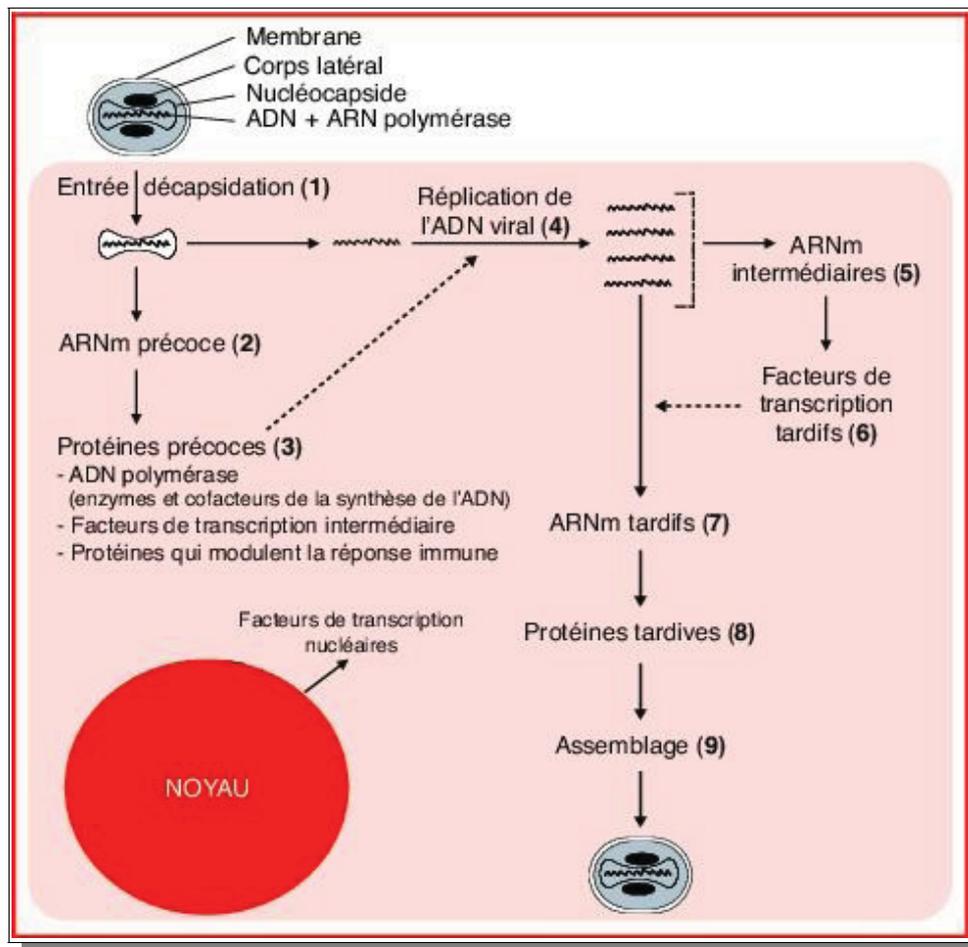


Figure 16 : Principales étapes de la répllication des poxvirus dans leur ordre chronologique de 1 à 9

(Drillien R *et al.*, 2003)

iii. Les poxvirus atténués recombinants

- **Description**

La méthode originale et la plus utilisée pour générer des virus de la vaccine recombinants (VacVr), est la recombinaison homologue (Fig 17. 1.) (Mackett M *et al.*, 1984). Des cellules permissives, préalablement infectées avec le virus parental, sont transfectées avec le plasmide de transfert contenant le gène recombinant sous contrôle d'un promoteur provenant du virus de la vaccine, entouré de séquences flanquantes de plusieurs centaines de bases dérivant du génome viral. Une multitude de méthodes

permet l'isolement des virus recombinants, comme par exemple la sélection basée sur le bromodésoxyuridine pour la délétion du gène de la thymidine kinase, la résistance à l'acide mycophénolique conférée par l'expression de la xanthine-guanine phosphoribosyl transférase (*gpt*), la détection d'un marqueur colorimétrique (β -galactosidase, α -glucuronidase) ou l'hybridation de l'ADN viral (Carroll M, 2003). L'expression des gènes recombinants requiert la présence de promoteurs viraux. Les séquences promotrices ont une taille moyenne de 30 paires de bases et appartiennent à plusieurs classes (précoce, intermédiaire, tardif, précoce-tardif...), différentes par leur efficacité de transcription. Les promoteurs précoces sont exprimés avant la réplication de l'ADN, les promoteurs intermédiaires et tardifs sont exprimés après la réplication de l'ADN. Afin d'atteindre une expression forte et précoce du gène, de nombreux vecteurs contiennent des promoteurs précoces/tardifs naturels, modifiés ou synthétiques (Wyatt LS *et al.*, 1996). La souche du virus de la vaccine la plus couramment utilisée est la souche neurovirulente WR (Western Reserve). La souche Copenhague, fortement utilisée en Europe, a été employée avec succès comme véhicule d'immunisation pour la vaccination anti-rabique (Kieny MP *et al.*, 1984). Plusieurs systèmes d'expression, basés sur des souches du virus de la vaccine déficientes dans leur réplication, ont été développés. A ce jour, deux souches non réplicatives (NYVAC et « Modified Ankara Virus » (MVA)) ont été approuvées par l'Institut National de la Santé américain (NIH) pour leur utilisation clinique.

La souche NYVAC dérive de la souche Copenhague par élimination de 18 phases ouvertes de lecture, impliquées dans la pathogénicité des *Orthopoxvirus* et la restriction d'hôte (Tartaglia J, *et al.*, 1992). Dans les lignées humaines, la réplication de la souche NYVAC est bloquée à un stade précoce, alors que les cellules embryonnaires de poulet (CEP) ou les cellules rénales de singe (VERO) sont permissives à l'infection (Perkus ME *et al.*, 1995). Les propriétés biologiques de la souche NYVAC incluent : l'absence de réplication dans la majorité des cellules humaines ou murines testées ; et l'innocuité de l'utilisation dans des systèmes animaux immunocompétents et immunocompromis.

La souche MVA est non virulente chez l'animal sain ou immunodéprimé et n'a pas induit d'effet indésirable chez 120000 personnes vaccinées lors de son utilisation en Allemagne dans les années 1970 (Moss B, 1996). La souche MVA a été obtenue

après 574 passages de la souche Ankara sur des cellules embryonnaires de poulet, aboutissant à un virus non propagatif sur la plupart des cellules de mammifères (Meyer H *et al.*, 1991 ; Mayr A *et al.*, 1978). La souche MVA est bloquée au stade de l'assemblage des virions (Carroll MW *et al.*, 1997). La souche MVA comporte 6 délétions majeures de l'ADN génomique résultant en la perte d'environ 15% du génome viral (Meyer H *et al.*, 1991 ; Antoine G *et al.*, 1998). L'infection par la souche MVA permet l'obtention de titres élevés (10^{10} à 10^{11} particules infectieuses/ml après purification) en cellules embryonnaires de poulet (CEP) et dans les cellules rénales de hamster (BHK-21). L'ensemble de ces technologies est également applicable aux autres membres de la famille des *Poxviridae* comme le fowlpox, le capripox, le camelpox ou l'entomopox.

- **Utilisation**

Un vaccin thérapeutique stimulant une réponse immunitaire antitumorale a été développé par Transgène. Il est construit à partir d'un virus recombinant de la vaccine qui contient des séquences codant pour l'antigène MUC1 humain et l'interleukine 2 humaine. En 2007, ce produit (TG4010) était en cours d'étude de phase IIb clinique pour des patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules (Ramlau R *et al.*, 2008). A ce jour, Transgène a obtenu un avis scientifique positif de l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) sur l'étude de phase IIb/III.

Un autre produit développé par Transgène utilisant la technologie MVA est un vaccin thérapeutique anti-infectieux d'immunothérapie active spécifique. Il cible le virus de l'hépatite C responsable de nombreux cancers du foie. La stratégie vaccinale consiste à induire une réponse immune forte (cellules T CD4+ et CD8+ spécifiques) contre les protéines NS3, NS4 et NS5B, de manière à détruire les cellules infectées par le virus de l'hépatite C. Une étude clinique de phase I est actuellement en cours (Fournillier A *et al.*, 2007 ; Martin P *et al.*, 2008).

iv. Essai clinique : utilisation du virus de la vaccine comme vecteur des protéines E6 et E7

En 2003, le virus de la vaccine exprimant les protéines E6 et E7 des papillomavirus a été testé comme vaccin thérapeutique de tumeurs intra-épithéliales vulvaire et vaginale.

Il s'agit de la phase II d'une étude pour tester son efficacité et son innocuité sur des femmes atteintes de tumeurs intra-épithéliales vulvaires et vaginales (Baldwin PJ *et al.*, 2003). Toutes ces femmes ont des tumeurs de haut grade.

- **Patientes**

Les sujets de l'essai clinique sont des femmes âgées de 18 à 60 ans avec des tumeurs intra-épithéliales vulvaires, vaginales ou anogénitales de haut-grade (Tableau 1). Elles ont été diagnostiquées par histologie sur biopsie et dépistées pour d'éventuelles anomalies hématologiques, biochimiques ou immunologiques. Ont été exclues de l'essai les femmes pour qui l'utilisation du virus de la vaccine vivant pourrait être dangereux pour leur santé ou celle de leurs proches. Ainsi, les femmes présentant une immunosuppression (incluant les femmes recevant un traitement immunosuppresseur), un antécédent de réaction allergique sévère, un eczéma atopique actif, ou des maladies inflammatoires généralisées ont été exclues. De plus, les femmes en contact avec des enfants de moins de 5 ans ou des personnes présentant une immunodépression ou un eczéma actif ont été également écartées. Les femmes enceintes n'ont pas participé à l'essai. Après le dépistage d'éventuelles maladies hématologiques ou la mise en évidence d'immunodépression, ou autres dysfonctions organiques (rein, foie), seules douze femmes, âgées de 42 à 54 ans avec une moyenne de 46 ans, ont été incluses dans l'essai. Onze femmes présentaient un cancer vulvaire et la dernière, un cancer vaginal. Après la vaccination, elles ont été suivies pendant une période de 6 mois. La fréquence des visites est mensuelle jusqu'à trois mois, puis une visite finale à 6 mois. Aucun autre traitement contre les tumeurs n'a été donné pendant l'essai, ni pendant le mois précédant la vaccination.

Patiente	Age (années)	Maladie	Durée	HPV
1	48	VIN 3	11 ans	16
2	49	VIN 3	8 ans	16
3	47	VIN 3	1 an	16
4	49	VIN 3	2,5 ans	16
5	44	VAIN 2	3 mois	16
6	47	VIN 3	6 mois	16
7	42	VIN 3	1 an	16
8	49	VIN 3	2 ans	16
9	45	VIN 3	3 mois	16
10	42	VIN 3	4 mois	33
11	52	VIN 3	14 ans	16
12	53	VIN 3	3 mois	16

Tableau 1 : Patientes recrutées dans l'essai clinique

VIN 3 : néoplasie intra-épithéliale vulvaire de grade 3 (dysplasie sévère)

VAIN 2 : néoplasie intra-épithéliale vaginale de grade 2 (dysplasie modérée)

(Baldwin PJ *et al.*, 2003)

HPV : Human Papillomavirus

- **Vaccinations**

Le virus recombinant utilisé est TA-HPV : virus de la vaccine exprimant les protéines E6 et E7 modifiées des virus HPV-16 et HPV-18.

Le virus ($2,5 \cdot 10^5$ plaque-forming units) est introduit par scarification de la peau en haut du bras. La surface est recouverte d'un pansement imperméable, changé deux fois par semaine jusqu'à la formation d'une croûte, qui résulte de l'inflammation induite localement par le virus. Toutes les semaines, des échantillons sont prélevés sur le pansement ou la croûte afin de tester les éventuels risque de contamination du milieu par le virus.

- **Résultats**

Les douze femmes avaient été diagnostiquées atteintes de tumeurs anogénitales entre 3 mois et 14 ans (moyenne à 3,4 ans) avant le début de l'essai clinique. Onze femmes atteintes d'un cancer vulvaire de grade III et une atteinte de cancer vaginal de grade II. Toutes les patientes sont infectées par un PVH à haut risque ; onze par le PVH-16 et une par le PVH-33.

- **Innocuité**

Aucun effet délétère n'a été mis en évidence sur les fonctions rénale, hépatique ou de la moelle osseuse. Toutes les patientes se sont bien senties pendant et après la vaccination. Une réaction locale sur le site de la vaccination au bout de 7-10 jours est notée mais seulement 2 patientes ont des difficultés temporaires à bouger le bras. Les écouvillons prélevés chaque semaine sur l'extérieur du pansement avant son retrait montrent aucun risque de contamination du milieu extérieur à travers le pansement. Par contre lors du dernier échantillonnage contenant la croute, 5 échantillons sont positifs pour TA-HPV, contre 7 ne présentant pas de virus vivant. Une petite cicatrice demeure au site de vaccination.

- **Réponse clinique**

Dix des femmes vaccinées (83%) présentent une réduction moyenne de 40% de la taille de la tumeur 6 mois après la vaccination. Pour une femme (atteinte de la tumeur vaginale), il y a guérison totale avec une analyse histologique normale 3 mois après la vaccination. Pour 9 femmes, le grade de la tumeur reste inchangé, mais il y a une réduction de l'étendu des tissus anormaux ; cette réduction va de 22 à 65%, avec 5 femmes qui présentent une réduction de moitié. Pour 2 femmes, il n'y a aucune diminution de la tumeur.

A la fin de l'étude, les 11 femmes atteintes de cancer vulvaire présentent toujours le même PVH, la femme atteinte du cancer vaginal n'a plus de PVH-16 détectable. Pour la différence de symptomatologie (irritation, douleur, inflammation) avant et après la vaccination : 3 femmes notent une légère aggravation, 3 autres, une légère amélioration et les 6 autres femmes n'y trouvent aucun changement.

- **Réponse immunitaire**

- contre le virus de la vaccine

Pour surveiller l'impact du vaccin sur le système immunitaire, les réponses contre la vaccine ont été mesurées. Des réponses à médiation humorale et cellulaire contre la vaccine ont été mises en évidence.

- contre PVH-16

Le vecteur TA-HPV a induit une réponse cellulaire spécifique dirigée contre E6 et E7. Chez 6 patientes, la quantité de lymphocytes T spécifiques de E6 et E7 a beaucoup augmenté après la vaccination.

c. Bilan

La vaccination par le TA-HPV n'a pas eu d'effet délétère, globalement les patientes se sont senties bien tout le long de l'étude, sans épisode de fièvre rapporté. Le pansement porté pendant 25 jours a bien été toléré par toutes. Les signes cliniques n'ont pas été significativement augmentés ni améliorés.

Aucune progression de la maladie n'est détectée pendant l'essai. Aucun changement de grade de malignité pour onze femmes, mais la réduction de taille pour dix des douze femmes est prometteur. Pour cinq femmes la réduction est supérieure à 50 %, et pour une la réduction est totale.

Cette étude apparaît bénéfique : idéalement, la vaccination dans le cadre des cancers vaginaux associés aux PVH est indiquée puisqu'elle a ici montré un cas de guérison complète sans rechute ultérieure. De plus, elle permet d'induire une réponse immunitaire cytotoxique contre les cellules qui présentent le génome viral (PVH). Même si la réduction n'est que partielle pour les cancers vulvaires, elle permet au moins un traitement chirurgical moins délabrant par la suite.

Ainsi, de nombreux essais cliniques plus ou moins avancés sont en cours afin de développer une réponse immunitaire spécifique contre les cellules tumorales par le biais de vecteurs viraux. Nous avons vu que quelles que soient les méthodes

utilisées/testées, il est nécessaire d'identifier des TAA afin de lutter spécifiquement contre la tumeur cible. L'immunothérapie antitumorale faisant intervenir des vecteurs viraux traite également de modulation de la réponse immunitaire.

B. Vecteurs viraux et immunothérapie antitumorale : modulation de la réponse immunitaire

L'utilisation de vecteurs viraux dans l'immunothérapie antitumorale dans le but de stimuler le système immunitaire de façon non spécifique repose essentiellement sur deux stratégies : d'une part, les vecteurs viraux peuvent être injectés localement, par voie i.t. (intratumorales) *in vivo*, et d'autre part, les cellules tumorales peuvent être modifiées génétiquement *ex vivo* puis réadministrées une fois transduites. La transduction *ex vivo* de Lymphocytes B a également été explorée.

L'injection intratumorale de vecteurs viraux codant pour des molécules immunostimulatrices cherche à préparer le système immunitaire localement pour mieux cibler les cellules tumorales et stimuler la réponse immunitaire.

I. Injection intratumorale de vecteurs viraux

a. Stratégie

Dans le cadre de l'immunothérapie anticancéreuse, la modulation de l'immunité peut se faire par administration locale *in vivo* de molécules immunostimulatrices : cytokines et molécules de co-stimulation.

i. Vecteurs viraux et expression de cytokines

● Cytokines : présentations

Les cytokines sont des glycoprotéines régulatrices sécrétées par de nombreuses cellules blanches et par certaines cellules constitutives de l'organisme. Leur taille est généralement inférieure à 30 kDa. Elles ont pour but d'induire, de contrôler ou d'inhiber l'intensité et la durée de la réponse immunitaire, ainsi que les mécanismes d'hématopoïèse et certaines différenciations et proliférations tissulaires .

Leur mode d'action peut être autocrine, paracrine ou endocrine. A ce titre les cytokines sont souvent qualifiées d'« hormones » propres au système immunitaire. En se liant à des récepteurs des cellules cibles, elles déclenchent des voies de transduction de signal modifiant l'expression des gènes de ces cellules. Leurs affinités avec leur récepteurs sont fortes, des concentrations picomolaires suffisent parfois à engendrer un effet biologique. Elles ont une demi-vie très courte, ce qui limite leur temps d'action ainsi que leur rayon d'action.

Les cytokines agissent rarement seules mais de manière conjointe avec d'autres cytokines, créant tout un réseau de communication cellulaire. Les cytokines ont divers attributs :

- x Pléiotropie : elles ont la capacité d'induire différents effets selon leur cible, ou d'activer plusieurs cibles différentes (ex : l'IL-4 produite par les $LT_{helpers}$ activés stimule la prolifération des LB activés, des thymocytes dans le thymus et des mastocytes).
- x Redondance : différentes cytokines ont le même effet biologique (ex : IL-2, IL-4, IL-5 stimulent la prolifération des LB).
- x Synergie : les effets combinés de deux cytokines sont supérieurs à la somme de leurs effets séparés.
- x Antagonisme : capacité d'une cytokine à inhiber un effet biologique (IL-10 bloque la production de cytokines chez les macrophages et freine indirectement la réponse immunitaire).
- x Induction de cascades : une chaîne de communication cellulaire s'établit (ex :

Les $LT_{helpers}$ activés produisent de l'IL-2 qui va activer d'autres $LT_{helpers}$ qui vont sécréter d'autres cytokines activant des LB qui vont à leur tour sécréter des cytokines pour activer la fabrication d'anticorps chez les plasmocytes).

Les cytokines sont aujourd'hui classées en quatre grandes familles :

- x les hématopoïétines (cytokines de classe I) : GM-CSF, G-CSF, IL-2 à 7, IL-11 à 13, IL-15...
- x Les interférons (cytokines de classe II) : IL-10, IFN α , β , γ , ...
- x Les chémokines : IL-8, ...
- x Les Tumor Necrosis Factor : TNF α , β ,...

De nombreux vecteurs viraux ont été utilisés pour délivrer des cytokines et les résultats prouvent l'efficacité de ces vecteurs à délivrer et faire exprimer ces gènes *in vivo*. Étant donné le mode d'action des cytokines, cette stratégie nécessite un maintien de l'expression des gènes transférés pour obtenir un effet optimal qui correspond à un recrutement des cellules immunitaires (cellules présentatrices d'antigènes, cellules effectrices) et leur activation. Les retrovirus, adénovirus et HSV se sont révélés efficaces pour cette stratégie, en assurant une importante expression pour une durée moyenne à longue.

- **Vecteur viraux codant pour l'interleukine-12**

L'IL-12 est sécrétée par les macrophages et les LB, elle induit, en synergie avec l'IL-2, la différenciation en CTL, et stimule la prolifération des NK, LAK (*Lymphokine Activated- Killer cells*), $T_{helpers1}$ activés.

De nombreuses études utilisant un vecteur viral délivrant l'interleukine 12 (IL-12), une cytokine aux nombreuses propriétés antitumorales, ont été réalisées. L'administration intratumorale d'un vecteur dérivé d'adénovirus codant pour IL-12

permet une régression totale des tumeurs chez la plupart des animaux avec un temps de survie prolongé, pour différents types de carcinomes (Barajas M *et al.*, 2001 ; Caruso M *et al.*, 1996) et de tumeurs qui ressemblent étroitement à celles des maladies humaines (Divino CM *et al.*, 2000 ; Liu Y *et al.*, 2002 ; Nasu Y *et al.*, 1999).

Le virus de la forêt de Semliki a également été utilisé pour délivrer l'IL-12 ; son administration intratumorale engendre une régression significative de la tumeur ainsi que l'inhibition de l'angiogénèse dans un modèle de mélanome B16 (Asselin-Paturel C *et al.*, 1999). Les vecteurs dérivés du SFV codant l'IL-12 ont prouvé leur efficacité dans d'autres modèles murins tumoraux : régression dans les modèles K-BALB (fibroblastes de souris, transformés par le virus de sarcome murin, qui induisent des tumeurs syngéniques agressives) et CT26 (cellules d'adénocarcinome colique) ainsi que l'inhibition de la tumeur primaire et des métastases pulmonaires dans le modèle 4T1 (lignée tumorale d'adénocarcinome mammaire) (Chikkanna-Gowda CP *et al.*, 2005).

- **Vecteurs viraux codant pour l'interleukine-2**

L'IL-2 est sécrétée par les LTh 1 et agit sur les CTL et les LTh activés en permettant leur prolifération, sur les clones de LT spécifiques d'un antigène en assurant une croissance de longue durée, en augmentant l'activité de certains NK ou CTL.

La capacité de l'IL-2 à stimuler la réponse immunitaire antitumorale l'a conduite dans les essais de thérapie génique anticancéreuse. Elle exerce ces effets à proximité de la tumeur et l'injection intratumorale d'adénovirus recombinant codant pour IL-2 induit une régression tumorale dans plusieurs modèles (Porgador A *et al.*, 1993 ; Addison CL *et al.*, 1995 ; Abdel-Wahab Z *et al.*, 1997 ; Zhang R *et al.*, 1999). Les principaux effecteurs responsables de cette régression sont les cellules Natural Killer, les lymphocytes T cytotoxiques aussi bien les TIL qui sont stimulés par l'IL-2 produite localement (Tsai SC *et al.*, 1993 ; Fearon ER *et al.*, 1990). Occasionnellement, l'immunité antitumorale induit aussi une mémoire immunitaire contre la lignée de cellules tumorales (Addison CL *et al.*, 1995).

L'utilisation de vecteurs adénoviraux pour apporter l'IL-2 *in vivo* a été développée pour contrer la toxicité des effets secondaires engendrée par l'administration massive d'IL-2 recombinante par voie systémique (Bukowski RM 1997 ; Siegel JP *et al.*, 1991 ; Anderson TD *et al.*, 1989). Toutefois, les approches de thérapie génique *in vivo* avec l'IL-2 présentent une fenêtre thérapeutique étroite due à la toxicité de l'IL-2 ; c'est pourquoi la dose virale est souvent limitée (Addison CL *et al.*, 1995 ; Bui LA *et al.*, 1997)

L'HSV a été utilisé pour apporter l'IL-2 dans des tumeurs sous-cutanées de modèles animaux : cette étude a démontré l'activation d'une réponse immunitaire et le prolongement de la durée de vie des souris traitées (D'Angelica M *et al.*, 1999).

L'efficacité antitumorale d'un vecteur dérivé d'un adénovirus codant pour l'IL-2 a été démontré dans un modèle de métastases hépatiques d'un cancer colorectal chez le rat-CC531. Le traitement intra-tumoral montre une régression significative de la tumeur. L'étude montre aussi l'effet adjuvant de l'adénovirus (Geutskens SB *et al.*, 2000).

- **Vecteurs viraux codant pour GM-CSF**

Le GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) module la prolifération et la différenciation de cellules hématopoïétiques (Metcalf D *et al.*, 1986) et semble être une cytokine immunostimulatrice qui accroît l'immunité antitumorale (Dranoff G *et al.*, 1993). Les cibles les plus importantes du GM-CSF sont les CD : il promeut la différenciation des CD et les aide dans leur fonction de phagocytose, et augmente l'expression de molécules de costimulation.

- **Vecteurs viraux codant pour des interférons**

Les interférons sont des cytokines dotées de multiples fonctions biologiques, incluant des activités antivirale et antitumorale. L'IFN α est utilisé dans le monde entier pour le traitement de 14 cancers différents, incluant des hémopathies malignes,

et certaines tumeurs solides comme le mélanome, le carcinome rénal et le sarcome de Kaposi.

L'étude de Santodonato L *et al.* a montré l'activité antitumorale produite par l'injection i.t. de vecteur adénoviral porteur d' IFN α sur des souris atteintes de tumeurs métastatiques et comparé cette activité aux résultats obtenus avec des injections répétées d'IFN. Il apparaît que l'injection d'adénovirus recombinants porteurs de gènes exprimant l'IFN α murin engendre une réponse immunitaire antitumorale marquée chez des souris transplantées avec des tumeurs métastatiques. De plus la production *in vivo* d'IFN est prolongée après l'injection du vecteur. La suppression de métastases a été observée après une seule injection de vecteur, alors qu'une telle réponse comparable est obtenue avec plusieurs injections d'IFN à haute dose. Cela suggère que l'apport de cette molécule par le biais de vecteurs viraux représente une bonne alternative aux usages cliniques conventionnels de cette cytokine chez les patients atteints de cancer (Santodonato *et al.*, 2001).

Les essais cliniques d'immunothérapie antitumorale faisant intervenir les vecteurs viraux apportant des molécules immunostimulatrices sont nombreux. Il est intéressant de noter que les vecteurs viraux peuvent éventuellement apporter plusieurs transgènes : on parle de cotransduction.

ii. Vecteurs viraux et expression de molécules de costimulation

Les molécules de costimulation sont essentielles lors de l'interaction CPA-lymphocyte pour l'activation des lymphocytes T naïfs et leur différenciation en cellules effectrices. La faible densité de molécules de costimulation au niveau des cellules tumorales engendre l'induction d'une tolérance à l'égard de celles-ci et une anergie des cellules effectrices à cause d'une présentation restreinte par les molécules du CMH de type I (Ramarathinam L *et al.*, 1994 ; Borrello I *et al.*, 2002).

- **Rappel sur l'interaction lymphocyte T-CPA**

Les LT expriment à leur surface un récepteur susceptible de reconnaître spécifiquement un peptide antigénique présenté par la molécule du CMH. Ce récepteur T ou TCR (*T Cell Receptor*) est un récepteur hétérodimérique α/β à activité tyrosine kinase particulier. En effet, les fonctions d'interaction avec le ligand, de phosphorylation et de transduction du signal TCR sont dissociées et portées par différentes protéines. Les chaînes α et β présentent une structure type immunoglobuline possédant une partie constante et une partie variable. Certains domaines hypervariables nommés CDR1, 2 et 3 (*Complementary Determining Region*) sont impliqués dans la reconnaissance de l'antigène (Davis MM et Bjorkman PJ, 1988). Un complexe associé appelé CD3 (γ , δ , ϵ et ζ) permet la transduction du signal de reconnaissance de l'antigène et l'expression des chaînes $\alpha\beta$ à la surface du lymphocyte. La molécule « corécepteur » CD8 exprimée par les LT cytotoxiques CD8+, ou CD4 exprimée par les LT auxiliaires CD4+, est associée au TCR et reconnaît une partie conservée au niveau de la tête du CMH. Cette molécule permet de stabiliser l'interaction des composants $\alpha\beta$ du TCR avec le complexe peptide-CMH (Davis MM *et al.*, 1998).

La structure macromoléculaire au point de contact entre le lymphocyte et la cellule cible ou CPA est désignée sous le terme de « synapse immunologique » (Grakoui *et al.*, 1999 ; Lanzavecchia *et al.*, 2000). L'engagement du TCR par le complexe CMH-peptide conduit à une réorganisation moléculaire de la synapse immunologique, nécessaire à l'activation du lymphocyte (Lanzavecchia *et al.*, 2000). La reconnaissance du complexe peptide-CMH par le TCR est extrêmement sensible et la présentation d'une centaine de complexes CMH-peptide à la surface de la CPA suffit à cette activation (Harding *et al.*, 1990 ; Christinck ER *et al.*, 1991).

Le modèle le plus répandu pour expliquer ce mécanisme postule l'existence de deux signaux. Le premier est fourni par le TCR des lymphocytes. Dans le cas des LT CD4+, ce signal est obtenu quand le TCR interagit avec un complexe Ag-CMH-II

présenté par les CPA (Cantrell, 1996). Pour les LT CD8+, il s'agit de la reconnaissance du complexe Ag-CMH-I. Le deuxième signal, dit de co-stimulation, est lui fourni par l'interaction entre les molécules B7.1 (CD80) sur la CPA et CD28 sur le LT. Ce deuxième signal ne peut être fourni que par une CPA activée. De ce fait, au début d'une réponse antigénique, l'activation d'un LT nécessite vraisemblablement un premier contact avec une CD. En l'absence de ce signal 2, le signal 1 rend les LT réfractaires à une activation subséquente, et ils entrent en anergie (Lenschow *et al.*, 1996). Ces deux signaux conduisent à la production de cytokines et à une sélection clonale, c'est à dire à l'induction spécifique de la prolifération du lymphocyte activé par le déterminant antigénique présenté. Au cours de cette phase d'expansion, se différencient des lymphocytes effecteurs proprement dits et des lymphocytes mémoires. Lors d'une seconde rencontre avec l'antigène, ces derniers permettront une réponse immune, dite secondaire, plus rapide et plus efficace que lors du premier contact. Ces lymphocytes mémoires sont à la base du mécanisme de vaccination préventive.

Suite à ce mécanisme d'activation, un LT CD4+ activé pourra prendre le relais et amplifier la réponse immunitaire grâce aux cytokines qu'il sécrète et à l'expression de nouvelles molécules de surface. Ainsi en exprimant le ligand CD40 (CD40L) qui va reconnaître le CD40 sur une CPA au repos, le lymphocyte provoque l'expression de CD80 (B7.1) et CD86 (B7.2) à la surface de cette dernière. Ces deux molécules de co-stimulation sont les ligands du récepteur CD28 qui est constitutivement exprimé à la surface des LT CD4+ (y compris les LT CD4+ naïfs). Ainsi la CPA stimulée par les LT CD4+ activés va être à son tour capable de recruter des LT CD4+ naïfs pour les activer. Cependant, l'ampleur de la réponse immunitaire est finement régulée. Par exemple, les molécules B7 peuvent également être reconnues par CTLA-4, qui est un homologue de CD28 de plus haute affinité pour les molécules B7, induisant un signal antiprolifératif aux LT CD4+. Son expression est régulée au niveau de l'ARNm ainsi que par des mécanismes post-transcriptionnels. Il n'apparaît à la surface des cellules T que 24 à 36 heures après leur stimulation.

Comme nous venons de le voir, un des plus importants récepteurs de molécules de costimulation présent à la surface des cellules T est CD28, où se fixent les ligands

de la famille B7 qui inclut B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86). Seulement les cellules tumorales expriment communément des molécules du CMH mais bien peu de molécules B7.1, et sans ce signal de costimulation, les cellules T deviennent anergiques en présence du 1er signal (Chen L *et al.*, 1992).

L'injection de molécules de costimulation en intratumorale est une importante stratégie d'immunothérapie, et plusieurs virus ont été utilisés comme vecteur pour délivrer ces molécules. Pour cette stratégie, il est important d'avoir une expression importante du transgène, mais une transcription continue n'est pas adaptée ; c'est pourquoi il ne faut pas un virus intégratif en tant que vecteur.

- **Vecteurs viraux codant pour B7.1**

La transfection *in vivo* par un vecteur adénoviral en i.t., s'est révélée intéressante pour traiter les ostéosarcomes. L'étude montre la mise en place d'une immunité antitumorale pour traiter la tumeur primaire et agir de façon systémique pour la disparition de métastases pulmonaires dans un modèle d'ostéosarcome chez le rat (Tsuji H *et al.*, 2002).

- **Vecteurs viraux codant pour CD40L**

CD40L est le ligand du récepteur CD40, exprimé à la surface de CPA. Il appartient à la famille des facteurs de nécrose tumorale (TNF), et joue un rôle important dans l'activation des LT CD4+. L'interaction CD40/CD40L induit une expression de B7-1, B7-2, LFA-3 et stimule la sécrétion de cytokines comme IL-8 et IL-12. L'administration d'un adénovirus codant pour CD40L engendre une régression tumorale totale chez 60 % des souris ayant un carcinome de la vessie et stimule une réponse immunitaire systémique spécifique (Loskog AS *et al.*, 2005).

Les vecteurs amplicons HSV codant pour CD40L ont été également testés dans des modèles murins de lymphomes ou d'adénocarcinomes : il en résulte un ralentissement de la croissance ou une éradication de la tumeur (Kuttubuddin M *et al.*, 1999 ; Tolba KA *et al.*, 2002).

b. Exemple : essai clinique de phase I/II utilisant un adenovirus porteur du transgène IL-2 chez des patients atteints de tumeurs solides et de mélanome

(Dummer R *et al.*, 2008)

i. Présentation

L'IL-2, initialement décrite comme un facteur de croissance des lymphocytes T, est une glycoprotéine immunomodulatrice produite par des lymphocytes T activés. *In vivo*, elle stimule la prolifération des cellules T, induit l'activation des CTL et des NK. Sa capacité à induire la régression de tumeurs métastatiques dans des modèles animaux a justifié son utilisation potentielle en immunothérapie antitumorale.

Chez l'homme, de hautes doses d'IL-2 sont capables d'induire des rémissions complètes et durables chez des patients atteints de carcinomes rénaux (Fyfe G *et al.*, 1995) ou de mélanome (Rosenberg SA *et al.*, 1985) ; ce qui a conduit à l'approbation par la FDA (*US Food and Drug Administration*) de leur utilisation pour ces pathologies dans les années 90. L'administration systémique d'IL-2 n'est pas seulement limitée par la courte demi-vie des IL-2 mais aussi par l'importante toxicité multiorganique qu'elle produit. Ainsi, c'est pour tenter de surmonter ces limites que l'administration en i.t. d'adénovirus vecteur pour l'IL-2 a été testée dans le modèle animal. Cette approche augmente l'immunogénicité de la tumeur et conduit à une régression tumorale aussi bien au site d'injection qu'à distance (métastases), suivie par le développement d'une immunité protectrice (Addison CL *et al.*, 1995 ; Haddada H *et al.*, 1993). Cette étude de cohorte à dose croissante est un essai clinique de phase I/II pour évaluer l'innocuité, l'efficacité et les effets biologiques d'injections i.t. répétées de TG1024 (adenovirus-IL-2) chez des patients (35) atteints de mélanome, ou de tumeurs solides à un stade avancé.

ii. Résultats

● Résultats cliniques

Les caractéristiques des patients et les résultats cliniques sont résumés dans le tableau en annexe 1. Les réponses cliniques sont :

- pas de réponse (PD) : progression de la maladie avec au moins 25% d'augmentation des lésions préexistantes et l'apparition de nouvelles lésions;
- réponse complète (CR) : rémission complète de la lésion traitée pendant au moins 4 semaines ;
- réponse partielle (PR) : diminution d'au moins 50% de la lésion en l'absence de progression de la maladie et sans apparition de nouvelles lésions ;
- stabilisation de la maladie (SD) : aucun changement et qui est exclu des critères de PD, CR, et PR.

On observe 6 réponses objectives sur 35 patients, soit 17%, de plus 4 patients présentent en plus d'une réponse locale, une stabilisation des métastases. Dans les cohortes 1 à 3 (3.10¹¹ vp) aucune réponse clinique n'est observée. Dans la cohorte 4, le patient 12 (mélanome de l'uvée) et 14 (cholangiocarcinome) présentent une stabilisation de la maladie au site d'injection durant le traitement. Dans la cohorte 5, le patient 17 (mélanome) montre une réponse partielle au site d'injection et une stabilisation des lésions distantes alors que le patient 21 (mélanome) est stable localement et à distance des injections. Les patients 22 (mélanome) et 23 (carcinome épidermoïde) de la cohorte 6 montrent des rémissions complètes des lésions traitées. Le patient 22, ayant montré une rémission totale de la tumeur traitée après 7 injections, a reçu de nouveau 13 injections dans une seconde tumeur qui a régressé complètement également (Fig 17). Dans la cohorte 7 qui ne contient que des patients atteints de mélanome, les 25 et 29 présentent une régression des lésions après un traitement combinant le TG1024 et la dacarbazine (agent chimiothérapeutique anticancéreux). De plus, le patient 29 présente une stabilisation de lésions non traitées. Le patient 30 est stable pendant le traitement pour les lésions traitées ou non. Les injections hebdomadaires dans la cohorte 8 permettent une rémission

complète d'une lésion traitée chez le patient 33 (mélanome), alors qu'une seconde lésion traitée demeure stable.

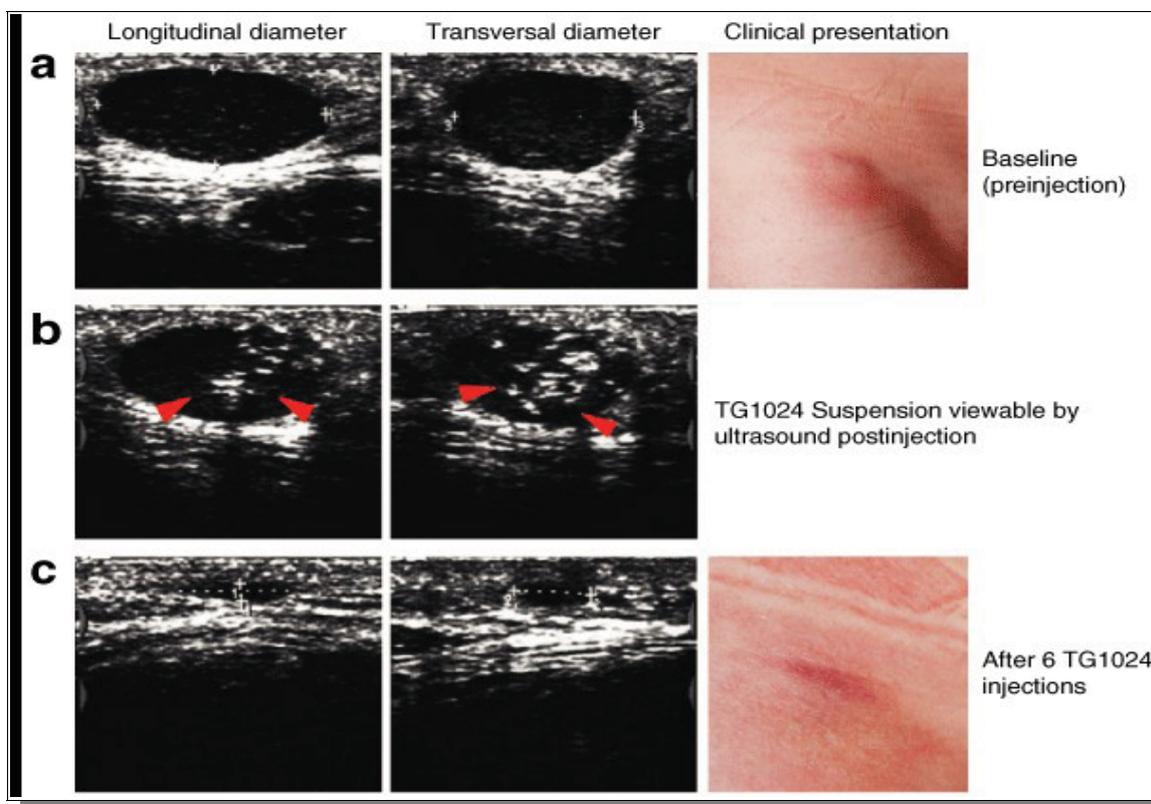


Figure 17 : Réponse clinique de la tumeur injectée du patient 22

a. Visualisation échographique et apparence clinique de la tumeur inguinale (1,8cm sur 1,42cm)

b. Visualisation échographique des TG1024 en suspension après l'injection intratumorale.

c. Visualisation échographique et examination clinique révélant une régression de la taille de la tumeur après six injections.

(Dummer R *et al.*, 2008)

- **Innocuité**

Il n'y a pas eu d'étude préalable de dose-limite de toxicité du produit. TG1024 a été bien toléré même à la plus haute dose ($3 \cdot 10^{11}$ vp). Cette dose est considérée comme la dose maximale à tester, en se basant sur les concentrations de TG1024 produits et

le volume d'injection.

Les effets secondaires rapportés les plus fréquents dans toutes les cohortes étaient une réaction au site d'injection (douleur, rougeur, enflure) et un syndrome grippal avec fièvre et frissons, suivi de nausées et vomissements. Les patients rapportent souvent des céphalées et de la fatigue. Dans les cohortes 7 et 8 des lymphocytopenies sont observées après l'injection mais n'ont pas de signification clinique.

Des échantillons de sang provenant des cohortes 1 à 5 ont été testés par PCR sur la présence d'ADN viral avant et après les deux premières injections de TG1024. Des résultats positifs sont observés chez tous les patients (sauf deux) 1 à 2 heures après l'injection, mais cet ADN persiste rarement plus de 24 heures. Un seul patient (15) a eu de l'ADN viral détectable jusque 15 jours après l'injection, mais aucun des patients n'est testé positif à la fin de l'étude.

- **Bilan**

Les vecteurs adénoviraux sont connus pour induire une activation des plaquettes et promouvoir la formation d'agrégats de plaquettes et leucocytes qui sont rapidement consommés par les macrophages, ce qui chez certains individus, mène à une sérieuse thrombocytopenie (Othman M *et al.*, 2007). Indépendamment des titres initiaux en anticorps anti-adénovirus (*NAAAbs : neutralizing anti-adenovirus antibodies*), tous les patients présentent une forte réponse humorale suivant le premier cycle thérapeutique avec TG1024. Il n'y a aucune corrélation notable entre la réponse humorale et les doses de vecteur utilisées. Malgré la présence de ces anticorps, quelques patients ont montré une réponse clinique au traitement TG1024 ; ainsi, des anticorps neutralisants spécifiques d'un vecteur adénoviral semblent ne pas nécessairement entraver leur efficacité, comme cela a déjà été étudié à plusieurs reprises (Dummer R *et al.*, 2004 ; Urosevic M *et al.*, 2007).

Les données sur l'efficacité ont montré que 6 patients traités sur 35 ont eu une réponse clinique mesurable. Dans ce groupe de 6 patients, l'un était atteint de

carcinome épidermoïde cutané alors que les autres présentaient des mélanomes. D'après des études du début des années 90, les carcinomes épidermoïdes localisés répondent mieux à l'immunothérapie avec de l'interféron α recombinant avec un taux de réponse supérieur à 90% (Urosevic M and Dummer R, 2002). La chirurgie demeure le traitement de choix aussi bien pour les carcinomes épidermoïdes localisés que les métastases, et ces dernières peuvent aussi requérir de la radiothérapie et chimiothérapie (Motley R *et al.*, 2003 ; Nguyen TH *et al.*, 2002). Il a récemment été démontré qu'un vecteur adénoviral induit lui même une importante réponse IFN de type 1 dans une lésion injectée ; ce qui augmente l'effet du transgène et contribue à la régression de la tumeur (Urosevic M *et al.*, 2007). Le succès du traitement sur le patient ayant un carcinome épidermoïde métastasé, ainsi que les précédents résultats rapportant la sensibilité à l'immunothérapie des carcinomes épidermoïdes, laissent supposer qu'un intérêt potentiel existe dans l'utilisation de TG1024 pour traiter ces carcinomes métastasés et qu'il faut continuer à progresser dans ce domaine.

Stewart *et al.* ont testé l'injection i.t. d'adénovirus délété pour E1 et E3 porteur du transgène IL-2 dans des métastases sous cutanées de patients atteints de cancer du poumon ou de mélanome (Stewart AK *et al.*, 1999). La régression des métastases injectées est notée pour 6 des 23 patients (24%) ; cinq d'entre eux sont atteints de mélanomes.

Malgré l'existence de TAA bien décrits et une myriade de stratégies d'immunothérapie possibles, les mélanomes métastatiques sont bien connus pour être difficiles à traiter. Il apparaît qu'une faible proportion de patients est en fait capable de développer une réponse immunitaire contre ces antigènes (Atkins MB, 2006). La haute concentration sérique d'IL-2 obtenue après l'injection des recombinants engendre une régression locale des tumeurs chez seulement quelques patients. La maladie à un stade avancé avec l'immunosuppression induite sont probablement responsables de ces conclusions (Kim R *et al.*, 2006).

Les injections i.t. de TG1024 ont induit un afflux considérable de cellule T CD8+ (considérées comme un composant essentiel de l'immunité antitumorale) dans les

lésions traitées. Les paramètres immuns évalués dans cet essai suggèrent que les injections i.t. de TG1024 ont la capacité à stimuler la réponse immunitaire de l'hôte localement mais aussi de façon systémique.

Seulement trois essais cliniques, dont celui-ci, ont été menés pour étudier les effets des injections i.t. de vecteurs adénoviraux portant l'IL-2 dans le cadre de traitement anticancéreux (Stewart AK *et al.*, 1999 ; Trudel S *et al.*, 2003). Leurs résultats sont similaires quant à l'innocuité et la relative absence de toxicité de cette stratégie. De plus, toutes ces études mettent en évidence la possibilité de cette stratégie à induire des régressions tumorales. D'autres études sont en cours afin d'évaluer les caractéristiques des patients, le type de tumeur et la combinaison de molécules qui serait le plus bénéfique aux patients.

II. Transduction *ex vivo* de cellules tumorales autologues

a. Stratégie

Les vaccins basés sur l'utilisation de cellules tumorales modifiées génétiquement offrent l'opportunité de traiter les patients avec des cellules autologues, de la même façon que la modification génétique *ex vivo* de CD. Ces transferts de gènes permettent une expression élevée de cytokines ou de molécules de co-stimulation à proximité des cellules tumorales et des antigènes tumoraux. Ainsi elles peuvent être sécrétées à proximité de la réponse immune se produisant et réduire ou limiter l'action des LT CD4+, réputés être un facteur limitant d'une réponse antitumorale efficace (Gilboa E, 1996 ; Rosenberg SA *et al.*, 1992 ; Pardoll DM, 1993). Ces vaccins ont l'avantage de ne pas avoir à définir un antigène spécifique de tumeur, ce qui est intéressant pour les maladies hétérogènes comme la leucémie myéloïde aiguë ; cependant l'inconvénient est qu'il s'agit de vaccin individuel qui doit être préparé pour chaque patient. De plus, l'utilisation de cellules tumorales autologues nécessite un temps de préparation *ex vivo*, pendant lequel la maladie continue sa progression.

b. Exemple 1 : utilisation d'un virus déficient Herpès Simplex-2 vecteur pour les gènes Il-2, GM-CSF et B7-1 dans un modèle de carcinome épidermoïde

(Kim SH *et al.*, 2000)

Un tiers des personnes atteintes de carcinome épidermoïde à un stade avancé de la tête et du cou présente une espérance de vie de 5 ans avec les thérapeutiques habituelles (Vokes EE *et al.*, 1993). Les patients atteints de tels cancer attendent le développement de nouvelles thérapeutiques afin d'améliorer le contrôle du cancer localement et leur survie. Plusieurs stratégies de thérapie géniques ont été étudiées (Clayman GI *et al.*, 1996 ; O'Malley BW *et al.*, 1996 ; Myers JN *et al.*, 1998). Ici, l'utilisation de vecteurs DISC est mise en évidence pour transduire des cellules tumorales SCCVII : cellules cancéreuses de carcinome épidermoïde qui poussent spontanément sur des souris C3H/HeJ.

i. HSV : présentation, avantages et inconvénient de leur utilisation en tant que vecteur

Il existe deux types d'herpès simplex virus humains (HSV), le type I et le type II (HSV1 et HSV2) qui appartiennent tous les deux à la famille des *Herpesviridae* et à la sous-famille des *Alphaherpesvirinae*. Le HSV2 est un virus pathogène pour l'Homme, associé aux maladies sexuellement transmissibles. Le HSV1 est aussi pathogène pour l'Homme et provoque généralement des stomatogingivites ou des infections de la peau (Levine DP *et al.*, 1980). Le HSV1, après infection, suit généralement une voie rétrograde le long du système nerveux vers la moelle épinière dorsale où il reste en phase latente en attendant une baisse d'immunité. Les virus de l'herpès simplex humains peuvent infecter une grande variété d'organes comme les muscles, les poumons, le foie, les îlots pancréatiques, avec un tropisme particulier *in vivo* pour les cellules du système nerveux (Lachmann RH *et al.*, 1999 (a)).

Le HSV1 est le plus exploré en thérapie anticancéreuse. C'est un virus d'environ 150 à 200 nm de diamètre, constitué de 4 éléments : l'enveloppe, le tégument, la capsid et le génome viral. L'enveloppe est dérivée de la membrane cellulaire et contient approximativement 12 glycoprotéines essentielles pour l'entrée du virus dans

la cellule hôte. Le tégument est une couche de 10 protéines entre l'enveloppe et la capsid. Ces protéines permettent d'éteindre la synthèse protéique de l'hôte et d'activer immédiatement l'expression et l'assemblage des protéines précoces. La capsid icosaédrique est constituée de 7 protéines et contient le génome linéaire double brin d'environ 152 kb codant 70 à 80 protéines différentes. Le génome de l'HSV est divisé en une région unique longue (U_L) et une région unique courte (U_S) qui sont flanquées de régions terminales répétées (Shen Y *et al.*, 2006). Quatre glycoprotéines (gX), présentes dans l'enveloppe du virus, sont nécessaires à l'interaction et à l'entrée du virus dans la cellule hôte. L'attachement initial est médié par l'interaction des protéines gB et gC avec des glycosaminoglycanes et des héparanes sulfates présents à la surface des cellules (Spear PG *et al.*, 1992). La glycoprotéine gD s'attache alors à un récepteur cellulaire connu comme étant médiateur de l'entrée des virus de l'Herpès (nectine 1-a, 1-b, 2a, 2d ou HveA), qui résulte en la fusion du virion et de la cellule (Spear PG, 2004). Les gB, gD et le complexe gH/gL sont nécessaires à la fusion et permettent l'entrée de la nucléocapsid dans le cytoplasme (Cai WH *et al.*, 1988 ; Fuller AO *et al.*, 1989 ; Roop C *et al.*, 1993 ; DeLuca N *et al.*, 1981). Une fois entré dans le noyau, le génome viral se circularise et est transcrit par l'ARN polymérase de type II de l'hôte. La protéine virale transactivatrice VP16 induit alors l'expression d'un grand nombre de gènes précoces (gènes IE). Ces gènes IE (ICP0, 4, 6, 22, 27,...) sont eux-mêmes des régulateurs de l'expression de gènes, entrant dans les mécanismes de réplication virale et d'encapsidation (Burton EA *et al.*, 2002). La mutation de la protéine ICP4 entraîne la suppression de la capacité répliquative du HSV.

Les virions matures d'HSV sont formés durant différentes étapes comprenant l'assemblage de la capsid dans le noyau de la cellule, l'encapsidation du génome viral et le transfert dans le cytoplasme, à travers l'appareil de Golgi (Steven AC *et al.*, 1997 ; Homa FL *et al.*, 1997). Le tégument et l'enveloppe sont formés durant le transfert à travers l'appareil de Golgi. Les particules enveloppées d'HSV sont délivrées par des vésicules sécrétrices. Le cycle de réplication du virus de l'Herpès est généralement complet entre 18 et 20 heures (Shen Y *et al.*, 2006).

Le HSV possède la propriété de pouvoir infecter très efficacement les cellules

quiescentes (notamment neuronales) ouvrant ainsi une voie prometteuse vers la thérapie génique des maladies neurodégénératives. De plus, des vecteurs de virus de l'herpès déficients pour la réplication ont été développés pour obtenir des virus quiescents et persistants dans les neurones (Burton EA *et al.*, 2002).

Il existe deux types d' HSV1 utilisés comme vecteur pour la thérapie contre le cancer : les virus à réplication conditionnée, dans lesquels la délétion d'un gène non essentiel permet aux virus de préférentiellement infecter, se répliquer et détruire les cellules cancéreuses (virus oncolytique) et les virus déficients pour la réplication, dans le génome desquels sont insérés des transgènes de façon à inactiver un ou plusieurs gènes viraux essentiels. Ces vecteurs peuvent contenir une cassette d'ADN étranger de grande taille, environ 30 kb (Burton EA *et al.*, 2002). Le neurotropisme naturel de l'HSV1 en fait un vecteur très attractif pour le traitement des cancers du système nerveux. La thérapie anti-cancéreuse avec le virus HSV1 a surtout été utilisée dans le cadre de thérapie gène suicide (Spencer DM, 2000). En effet, le gène UL23 de l'HSV code pour une thymidine kinase qui peut convertir la prodrogue ganciclovir en métabolites cytotoxiques qui s'intègrent au sein de l'ADN des cellules en division (cellules cancéreuses) (Moriuchi S *et al.*, 1998).

Les amplicons constituent une autre variété de vecteurs HSV défectifs et non intégratifs dérivés du HSV-1, pouvant véhiculer jusqu'à 150kpb d'ADN exogène (Fraefel C *et al.*, 2000 ; Link CJ *et al.*, 2000). Leur génome ne contient aucun gène viral, ce qui leur confère une totale innocuité pour les cellules infectées et les animaux inoculés. Ils sont basés sur la capacité du HSV1 à assembler un génome défectif contenant seulement la séquence ori (origine de réplication) et la séquence pac nécessaire à l'assemblage des particules virales (Sena-Esteves M *et al.*, 2000). D'un point de vue structural et immunologique, les amplicons sont identiques au virus HSV-1 sauvage et par conséquent, possèdent le même spectre d'hôtes et de tissus. La différence majeure entre un vecteur amplicon et le HSV-1 réside dans la substitution du génome d'HSV-1, au sein de la particule virale, par un concatémère d'ADN plasmidique, qui forme ainsi le génome du vecteur amplicon. Le génome amplicon dérive d'un plasmide, appelé plasmide amplicon qui correspond à un plasmide

standard d'*Escherichia coli*. Il contient, en plus des séquences transgéniques d'intérêt, une origine de répllication virale (Oris) et un signal de clivage et d'encapsidation d'HSV-1.

La production d'amplicon fait intervenir plus d'une cinquantaine de protéines virales nécessaires à la répllication et l'empaquetage du génome amplicon. Le plasmide amplicon étant dépourvu de gènes viraux, les protéines codées par ces gènes doivent nécessairement être apportées en *trans*, soit par un HSV-1 auxiliaire, soit par de l'ADN viral, soit par des cellules transcomplémentantes.

Les vecteurs amplicon ont été utilisés dans la plupart des stratégies anticancéreuses. Ils sont en effet capables de transférer efficacement des gènes dans la plupart des cellules cancéreuses, *in vitro* comme *in vivo*. Cependant comme ils ne sont pas autorépliatifs, ils se diluent durant les divisions cellulaires. C'est pourquoi ils interviennent dans des études qui ont utilisé des méthodes drastiques, comme la destruction rapide des cellules cancéreuses.

Les vecteurs viraux DISC-HSV (*Disabled Infectious Single-Cycle Herpes Simplex Virus*) sont dérivés de l'HSV-2. Ils sont défectifs pour le gène codant pour la glycoprotéine H (gH), qui est essentielle pour permettre l'infection des cellules par le virus, c'est pourquoi ce vecteur ne peut procéder qu'à un seul cycle de répllication. En effet, la glycoprotéine gH est apportée par des cellules transcomplémentantes et les virus DISC peuvent infecter et transférer leur matériel génétique à la cellule, mais par conséquent leur descendance sera non infectieuse. L'innocuité de tels virus a été démontrée dans des études pré-cliniques (Dilloo D *et al.*, 1997 ; Bournnell MEG *et al.*, 1997). Les vecteurs DISC peuvent être utilisés aussi bien *in vivo* pour des administrations directes en i.t. qu' *ex vivo* pour transduire des cellules tumorales réadministrées ultérieurement.

ii. Les transgènes

L'exemple choisi est un modèle de cotransduction, c'est-à-dire que le vecteur viral est porteur de plusieurs gènes, il s'agit ici de gènes exprimant des molécules

immunostimulatrices.

- L'interleukine 2 : nombreuses sont les études d'immunothérapie l'utilisant pour ses propriétés de stimulation de l'immunité antitumorale.
- GM-CSF
- B7-1

Ces molécules ont été choisies car elles ont déjà prouvé leur efficacité immunostimulatrice dans d'autres modèles (Rosenberg SA *et al.*, 1992 ; Dranoff G *et al.*, 1993 ; Gansbacher B *et al.*, 1990 ; Porgador A *et al.*, 1993).

iii. Résultats

- **Les cellules SCCVII produisent *in vitro* GM-CSF et IL-2**

La production de GM-CSF ou d'IL-2 par les cellules SCCVII transduites par DISC-GMCSF ou par DISC-IL2 respectivement est démontrée par technique ELISA, 24 heures après la transduction. Cette production est proportionnelle à la quantité de vecteur viral (MOI= *multiplicity of infection*). Cela confirme l'efficacité du transfert de gène par les vecteurs DISC même dans des cellules quiescentes.

- **Effet préventif *in vivo* du transfert de gènes d'immunostimulation**

Les animaux sont vaccinés en s.c. avec des cellules SCCVII irradiées qui ont été transduites par des virus DISC porteurs de différents transgènes codant pour des molécules d'immunostimulation. Une semaine après la 3ème injection, les souris subissent une épreuve tumorale par injection de SCCVII dans chaque flanc. Les souris immunisées préalablement avec des DISC contenant des transgènes d'immunostimulation présentent une réduction significative, avec une amélioration significative de la survie. Les souris immunisées avec des cellules SCCVII non transduites ne présentent aucune amélioration sur la croissance tumorale.

Il est intéressant de noter que les souris immunisées par DISC-GMCSF présentent la meilleure protection contre la croissance tumorale. De plus, la vaccination avec GM-CSF seul a montré être de même efficacité dans la prévention du développement tumoral que la vaccination combinant GM-CSF à l'Il-2 ou B7-1, ou les deux.

- **Effet thérapeutique *in vivo* de DISC-GMCSF**

Les auteurs de l'étude ont choisi de tester uniquement le DISC-GMCSF dans le cadre de tumeurs établies, en raison des résultats précédemment obtenus. Des tumeurs SCCVII sont injectées en s.c. dans le flanc de souris C3H/HeJ. Une fois que les tumeurs ont atteint une taille de 5mm de diamètre, le vecteur DISC-GMCSF est injecté en i.t. et l'inhibition de la croissance tumorale est mise en évidence (Fig 18).

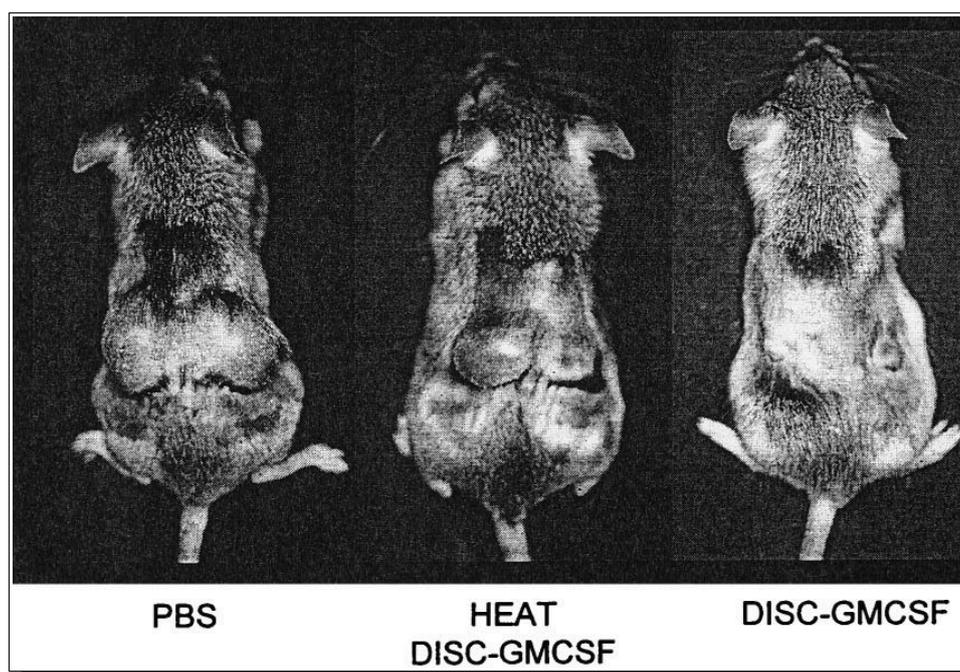


Figure 18 : Effet de l'injection de DISC-GMCSF en i.t. sur des modèles syngéniques de tumeurs

(Kim SH *et al.*, 2000)

PBS : souris traitée au PBS (groupe témoin).

HEAT DISC-GMCSF : souris traitée avec des virus inactivés par la chaleur.

DISC-GMCSF : souris traitée avec le vecteur.

c. Autres exemples : ostéosarcomes et lymphomes à cellules B

i. *Ostéosarcomes*

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'induction de l'expression de B7.1 par un adénovirus dans des cellules d'ostéosarcome a été montrée *in vitro* et *in vivo* chez un rat et a permis l'induction d'une réponse immunitaire contre les ostéosarcomes primaires, une protection systémique contre les métastases pulmonaires, une activation des lymphocytes T CD4+ dans les nœuds lymphatiques régionaux, mais aussi des CD, NK et une sécrétion d'IFN- γ (Tsuji H *et al.*, 2002).

Les cellules tumorales d'ostéosarcomes transduites *ex vivo* pour exprimer B7.1 induisent, une fois réadministrées, une immunité protectrice et curative par l'activation de CTL dirigés contre les cellules d'ostéosarcome, même contre celles qui ne sont pas transduites et n'expriment pas B7.1 (Hayakawa M *et al.*, 1997).

ii. *Utilisation d'un vecteur dérivé du virus Epstein-Barr pour transduire des cellules B tumorales*

(Hellebrand E *et al.*, 2006)

Le virus Epstein-Barr (EBV) est un virus herpétique humain qui possède un tropisme naturel pour les cellules B : en effet, il les infecte et établit une infection latente alors que le génome viral demeure extra-chromosomal. Ces caractéristiques sont intéressantes mais l'EBV est un virus oncogène ; ainsi les vecteurs seront dépourvus de ses gènes lytiques et oncogènes.

L'étude de Hellebrand E *et al.*, a mis en évidence que les vecteurs dérivés du EBV peuvent transférer le gène codant pour GM-CSF dans des cellules B humaines, incluant les cellules tumorales B résultant d'une leucémie lymphocytaire chronique. Il s'avère que le GM-CSF exprimé dans les cellules B transduites est biologiquement actif et stimule les réponses immunitaires. Par conséquent, le vecteur dérivé de EBV est un bon système pour la manipulation des cellules B *ex vivo* et la thérapie génique contre les lymphomes des cellules B.

La culture de cellules tumorales n'est cependant pas aisée et un grand nombre d'échecs est de ce fait observé (Copier J *et al.*, 2006).

De nombreuses études traitent de l'utilisation de vecteurs viraux afin de faire exprimer à des cellules tumorales des molécules d'immunostimulation dans le cadre de l'immunothérapie antitumorale.

Conclusion de la deuxième partie : Ainsi, nous avons vu dans quelle mesure étaient utilisés les vecteurs viraux dans le cadre d'une immunothérapie antitumorale. Leur utilisation ne se limite pas, bien entendu, au domaine des cancers : ils sont l'objet de recherche et d'avancées en thérapie génique. Par ailleurs, leur utilisation peut être combinée à d'autres stratégies de lutte antitumorale : notamment les thérapies monoclonales et la virothérapie.

Troisième partie :

Vecteurs viraux et immunothérapie antitumorale : combinaison avec la virothérapie et la thérapie monoclonale

A. Vectorologie et virothérapie dans l'immunothérapie antitumorale

I. Virothérapie oncolytique : présentation

La virothérapie oncolytique est récemment apparue comme une approche valable pour tuer spécifiquement des cellules tumorales (Fig 19). Cette thérapie, contrairement à celles évoquées jusqu'à présent, utilise des virus répliquatifs qui sont capables de se disséminer à travers le tissu tumoral pour infecter les cellules voisines. Ces virus infectent spécifiquement les cellules cancéreuses grâce à des marqueurs de surface ou grâce à l'expression intracellulaire de gènes liés aux tumeurs. Les virus utilisés en virothérapie se divisent en deux groupes ; les virus qui ont une activité oncolytique naturelle, et ceux que l'on fabrique. Les virus naturellement oncolytiques utilisés en virothérapie sont les réovirus (Alain T *et al.*, 2002 ; Hirasawa K *et al.*, 2002 ; Norman KL *et al.*, 2002), le virus de la maladie de Newcastle (Mullen JT *et al.*, 2002 ; Phuangsab A *et al.*, 2001), le virus de la stomatite vésiculeuse (Stojdl DF *et al.*, 2000 ; Stojdl DF *et al.*, 2003) et les parvovirus autonomes (Haag A *et al.*, 2000 ; Herrero YCM *et al.*, 2004 ; Moelher M *et al.*, 2001). Les virus utilisés après modification génétique sont les adénovirus, l'HSV1 et le virus de la vaccine.

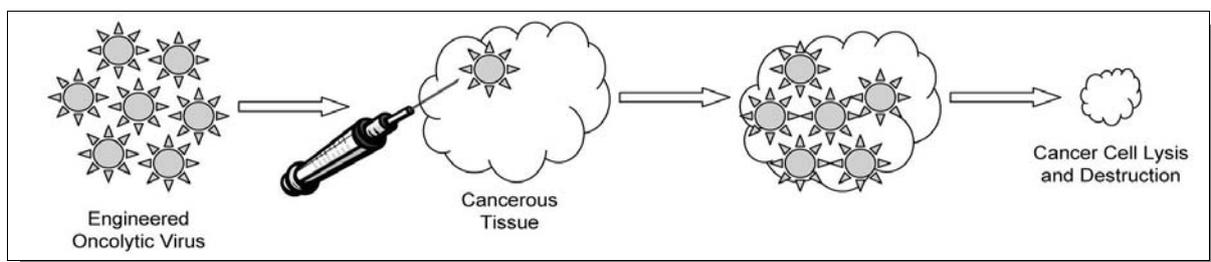


Figure 19 : Présentation schématique de la virothérapie oncolytique

(d'après Cross et Burmester, 2006)

a. Virus oncolytique : définition

Un virus oncolytique est un virus qui ne se réplique ou n'infecte que les cellules tumorales en aboutissant à leur lyse tout en épargnant les cellules normales. Il existe plusieurs virus possédant ces propriétés : certains ont un tropisme préférentiel pour les cellules tumorales, d'autres sont sélectionnés et/ou génétiquement modifiés dans ce but.

Historiquement, l'idée d'utiliser des virus comme agents thérapeutiques contre le cancer remonte au début du siècle dernier par observation de régression de tumeurs chez des patients suite à un épisode infectieux viral, ou une vaccination contre la rage. En effet, au début du siècle, une patiente atteinte d'un carcinome de l'utérus a subi une régression tumorale après une vaccination contre la rage. De plus, des rémissions ont été notées auprès de patients atteints de lymphomes de Burkitt et Hodgkin, après une infection naturelle par le virus de la rougeole (Bluming AZ *et al.*, 1971 ; Taqi AM *et al.*, 1981). Des expériences animales ont été menées suite à ces constats dans les années 1920. Dans les années 1950, des études portant sur l'effet oncolytique de certains virus sur des tumeurs humaines sont suivies puis abandonnées à cause de l'effet fugace observé, la croissance tumorale reprenant rapidement après le traitement (Newman W *et al.*, 1954).

L'avancée sur les connaissances de base de la virologie, du contrôle du cycle cellulaire et la découverte de la technologie de l'ADN recombinant ont permis la modification génétique du génome viral pour améliorer la sécurité d'utilisation et la spécificité tumorale, et donc permettre un retour des virus oncolytiques au premier plan des thérapies anti-cancéreuses. Cette approche fut pour la première fois tentée en 1991 avec un herpès virus de type I dans un modèle de gliome expérimental (Martuza RL *et al.*, 1991). Le nombre d'études pré-cliniques et cliniques de virothérapie oncolytique s'est alors très largement amplifié et cinq ans plus tard, l'adénovirus recombinant Onyx-15 est devenu le premier virus oncolytique à entrer dans un essai clinique.

Les virus oncolytiques présentent de nombreux atouts qui en font une arme thérapeutique potentielle contre le cancer : une spécificité tumorale, une capacité d'induction de mort cellulaire et/ou d'induction d'une réponse immunitaire contre les

antigènes spécifiques de tumeurs, de stimulation de la production de cytokines ; ajouté à cela leur faculté à atteindre des zones inaccessibles pour les thérapies conventionnelles.

Une dizaine de virus sont testés dans des essais cliniques : l'adénovirus Onyx-015 qui est déjà utilisé dans des études en phase III pour des tumeurs au cerveau, l'adénovirus CV706, le virus de la maladie de Newcastle et le virus de l'HSV1-G207 font partie des virus oncolytiques les plus aboutis et les plus utilisés (Tableau 2).

b. Différentes activités oncolytiques

L'activité oncolytique peut résulter de différentes propriétés des virus : alors que certains détruisent directement les cellules tumorales, d'autres dirigent une réponse immunitaire contre ces cellules, d'autres encore permettent une augmentation de la sensibilité des cellules tumorales aux thérapies conventionnelles. Enfin, d'autres peuvent libérer des gènes thérapeutiques au sein des tumeurs.

i. Virus oncolytique : caractéristiques idéales

L'efficacité et la sécurité sont des éléments importants à prendre en compte pour un virus oncolytique utilisé en thérapie. Les virus doivent infecter, se répliquer et détruire les cellules tumorales humaines. Le virus parental sauvage ne doit pas causer de pathologie sévère de part son activité intrinsèque au niveau des tissus sains et se doit d'être bien caractérisé. Un autre aspect au niveau de la sécurité d'utilisation d'un virus est sa non intégration au sein du génome de la cellule hôte ; en effet cette intégration pourrait induire des dommages imprévus comme des inhibitions ou des surexpressions de gènes (Kinzler KW *et al.*, 1996). Un virus à usage thérapeutique doit être génétiquement modifiable (excision ou intégration de gènes), pouvoir incorporer dans son génome une quantité suffisante d'ADN et être très stable au niveau génomique.

Virus	Activité oncolytique	Avantages	Inconvénients	Souche/mutant oncolytique étudié	Ingénierie biologique	Types de cellules testées / phase des essais cliniques	Réf.
NDV	Naturelle	Associé à des pathologies peu sévères, naturellement atténué, bonne connaissance des fonctions des gènes viraux, pas de transformation nécessaire	Réplication indésirable difficilement enrayerée	Casalefs 73T MTH-68/H PV701	Oncolysat de la souche sauvage	Mélanome(I), tumeurs rénales(I) Gliomes malins(I) Tumeurs solides avancées(I)	Sinkovics JG <i>et al.</i> , 2000 Csatary L.K <i>et al.</i> , 2004 Stodjil DF <i>et al.</i> , 2003 Coffey MC <i>et al.</i> , 1998 Hirasawa K <i>et al.</i> , 2003
Réovirus	Naturelle	Associé à des pathologies peu sévères, bonne connaissance des fonctions des gènes viraux, pas de transformation nécessaire	Difficilement manipulable génétiquement, pas d'essai clinique réalisé, réplication indésirable difficilement enrayerée	—	—	—	Belkowsky I.S., 1987 Connor JH <i>et al.</i> , 2004
VSV	Naturelle	Associé à des pathologies peu sévères, bonne connaissance des fonctions des gènes viraux, pas de transformation nécessaire	Difficilement manipulable génétiquement, pas d'essai clinique réalisé, réplication indésirable difficilement enrayerée	—	—	—	Rommelaers JC, 1991 Deleu <i>et al.</i> , 2002
Parvovirus autonome	Naturelle	Petit virus (bonne filtration des tissus), associé à des pathologies peu sévères, bon vecteur de thérapie génique, pas de transformation nécessaire	Effets secondaires (pathologies parfois sévères, voire fatales) fonction inconnue pour de nombreux gènes viraux	—	—	—	—
HSV1	Après manipulations génétiques	Facilement manipulable génétiquement, essais cliniques concluants, existence de drogues enrayant une réplication non voulue.	—	G207	Délétion des deux copies de γ 34.5 ; insertion de IL2	Gliomes malins (I)	Carew JF <i>et al.</i> , 2001
A.dénovirus	Après manipulations génétiques	Facilement manipulable génétiquement, essais cliniques concluants, bonne connaissance des fonctions des protéines virales, associé à des pathologies peu sévères	Réplication indésirable difficilement enrayerée	rFp450 Ave1A04i	Insertion de la cytochrome oxydase p450 du rat Délétion E3, insertion du promoteur de l'AFP	— Gliomes malins(I)	Freytag SO <i>et al.</i> , 2002 Ikeda K <i>et al.</i> , 1999 Li Y <i>et al.</i> , 2001
Vaccine	Après manipulations génétiques	Facilement manipulable génétiquement, essais cliniques concluants.	Réplication indésirable difficilement enrayerée, fonction inconnue pour de nombreux gènes viraux, effets secondaires (pathologies parfois sévères, voire fatales)	Oryx-015 CV706	Délétion du gène E1B-55kD Délétion d'E3, E1a sous contrôle du promoteur de la PSA	Tumeur du cerveau(I-III), des ovaires (I), du pancréas(I), du foie (I-II), gliomes malins(I) Tumeur de la prostate(I-II)	Héris <i>et al.</i> , 1997 ; Nemmaris J <i>et al.</i> , 2000 ; Goodman FD <i>et al.</i> , 1998 ; Neri SJ <i>et al.</i> , 2000 ; Hallebeck EL <i>et al.</i> , 1999 Kasuya H <i>et al.</i> , 2004
				—	Insertion de GM-CSF et <i>loxZ</i> dans le locus TK	Mélanomes(I-II)	Wallack MK <i>et al.</i> , 1998

Tableau 2 : Propriétés des différents virus oncolytiques, avantages et inconvénients des avancées des essais cliniques

(Szelechowski *et al.*, 2005)

Ces critères sont très importants afin d'améliorer l'activité du virus, par ajout de gènes (immunostimulateurs ou suicides) ou pour permettre une réplication et donc un ciblage spécifique du virus à la tumeur. Un mécanisme d'élimination du virus serait intéressant en cas de virémie ou de modification post-injection. Finalement, le virus doit être facile à produire avec des titres de production assez importants (Kinzler KW *et al.*, 1996).

ii. Oncolyse viro-induite naturelle

Certains virus ont la capacité de conduire à la lyse des cellules tumorales. Leur réplication leur permet l'invasion des cellules adjacentes, avec une augmentation de la charge virale, jusqu'à l'intervention d'une réponse immunitaire ou l'absence de cellule sensible proche.

L'oncotropisme des réovirus et du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) est dû à un défaut dans la voie de la protéine kinase cellulaire (PKR) ou des IFN, qui normalement bloque la réplication virale dans les cellules infectées. La transformation cellulaire par activation du proto-oncogène *ras* engendre une inhibition de la PKR et permet la réplication des virus dans les cellules infectées. Or, les réovirus humains se multiplient préférentiellement dans les cellules transformées par l'activation de l'oncogène *ras* (30% des tumeurs environ) (Coffey MC *et al.*, 1998 ; Hirasawa K *et al.*, 2003). Le VSV étant très sensible à l'inhibition de la synthèse d'ARNm par l'interféron α , il se multiplie préférentiellement dans les cellules ayant un défaut dans la voie d'activation des interférons (Belkowsky LS, 1987) ; de plus il a été démontré qu'il se réplique très bien dans les tumeurs hypoxiques (Connor JH *et al.*, 2004).

La transformation *in vitro* de cellules humaines permet certaines étapes d'infection des parvovirus (amplification de l'ADN viral, expression du génome viral et lyse cellulaire) (Rommelaere JC, 1991 ; Malerba M *et al.*, 2003). Cet oncotropisme est à lier avec la prédilection naturelle des parvovirus pour les cellules en prolifération et peu différenciées.

Malheureusement, malgré l'effet oncolytique de ces virus sauvages, qu'il s'agisse de réovirus, de VSV ou de parvovirus, aucune régression totale et irréversible de la tumeur n'a été observée. De plus, la réponse immunitaire de l'hôte contre le virus, acquise suite au traitement ou préalablement acquise, limite l'action oncolytique (Jackson GG *et al.*, 1973). La biologie moléculaire a permis d'améliorer les propriétés oncolytiques de virus naturellement oncolytiques ou d'assigner de telles propriétés à des virus ne les possédant pas initialement.

iii. Induction d'une immunité antitumorale

Certains virus permettent la destruction de cellules tumorales grâce à l'induction d'une réponse immunitaire spécifique ou non. Elle a été découverte par la combinaison de l'efficacité des virus oncolytiques et une immunité active tumeur-spécifique en préparant des lysats de cellules tumorales infectées, appelés oncolysats, utilisés comme préparation thérapeutique (Sinkovics *et al.*, 2000). Un oncolysat d'influenza PR8 s'est montré efficace contre des tumeurs ovariennes (Kurukawa *et al.*, 1989), un oncolysat du virus de la vaccine contre les mélanomes et bien d'autres induisant une réponse humorale contre les antigènes viraux et les antigènes spécifiques de tumeurs révélés par l'infection virale (Savage HE *et al.*, 1986). Les meilleurs résultats sont obtenus dans la prévention de rechutes métastatiques de mélanomes traités avec un oncolysat de la souche 73T du virus de Newcastle (Cassel *et al.*, 1992).

Cet effet provient du fait que certaines protéines virales rétablissent l'immunogénicité des cellules tumorales en induisant une immunité antitumorale spécifique qui permet la régression de la tumeur et une protection à long terme contre une récurrence éventuelle. En effet, l'infection virale des cellules tumorales peut induire la production de facteurs diffusibles capables d'activer les CPA (Moehler M *et al.*, 2003). De plus, l'expression conjointe de molécules du CMH-1 et d'antigènes viraux à la surface des cellules cancéreuses infectées peut induire une réponse CTL spécifiquement dirigée contre ces cellules. L'action lytique propre des virus est donc renforcée en favorisant la synthèse et la présentation d'antigènes spécifiques de tumeurs, ainsi qu'en activant une réponse immunitaire antitumorale. En outre,

l'infection des cellules tumorales peut les sensibiliser à certains facteurs cytotoxiques produits par les cellules effectrices : cas du TNF α et des cellules exprimant la protéine adénovirale E1A (Miura TA *et al.*, 2003).

Néanmoins, cette réponse immunitaire induite est à double tranchant puisqu'elle réduit le nombre de virus et donc l'efficacité du traitement.

iv. Augmentation de la spécificité d'autres thérapies

La sensibilité des cellules néoplasiques à la chimiothérapie ou la radiothérapie peut être augmentée par l'infection de virus oncolytiques. Les médicaments utilisés généralement pour tuer les cellules tumorales se révèlent plus ou moins toxiques pour les cellules normales, qui répondent au traitement généralement en entrant en apoptose ou en stoppant le cycle cellulaire *via* l'activation de suppresseurs de tumeurs comme p53 ou pRB, ce qui permet de limiter la propagation des substances médicinales dans le tissu sain. L'activation de p53 est aussi une réponse qui limite la propagation du virus dans les cellules voisines. Certains virus induisent une surexpression de p53, ce qui mène à une protection des cellules dont la voie de signalisation de p53 est active contre les agents thérapeutiques, contrairement aux cellules tumorales ayant un défaut de la voie d'activation de p53 qui se voient toujours sensibles aux thérapies.

c. Spécificité antitumorale des virus oncolytiques

Certains virus se sont adaptés et ont évolué pour modifier le phénotype des cellules infectées afin d'assurer au maximum leur réplication et leur survie. Les changements cellulaires induits par l'infection virale sont étrangement et étroitement similaires aux changements cellulaires acquis durant la carcinogenèse telles que l'inactivation de p53, l'inhibition de l'apoptose ou l'activation de cycle mitotique cellulaire. Il n'est donc pas très surprenant de constater un ciblage tumoral naturel de certains virus ou après modifications génétiques.

Quatre approches sont généralement décrites afin d'obtenir une réplication conditionnée à la tumeur :

- utilisation de virus naturellement tumeur-spécifiques (le réovirus (RV), le virus de la maladie de Newcastle (NDV), Vesicular Stomatitis Virus (VSV) (Coffey MC *et al.*, 1998 ; Stojdl DF *et al.*, 2000)) ;
- excision de gènes (Herpès Simplex Virus (HSV), virus de la vaccine) ou de régions fonctionnelles (adénovirus) nécessaires à la réplication et/ou la toxicité dans les cellules normales mais dont la fonction est complétée dans les cellules tumorales (Martuza RL *et al.*, 1991 ; Mastrangelo MJ *et al.*, 2000 ; Bischoff JR *et al.*, 1996 ; Heise C *et al.*, 2000) ;
- insertion de promoteurs spécifiques de tumeurs ou de tissus dans le génome viral pour limiter l'expression de gènes ou tout simplement la réplication du virus à la tumeur (promoteur de la télomérase) (adénovirus et HSV) (Hallenbeck PL *et al.*, 1999 ; Miyatake SI *et al.*, 1999) ;
- modification des protéines de surface du virus afin de cibler spécifiquement la tumeur (adénovirus et poliovirus) (Wickham TJ *et al.*, 1997 ; Alemany R *et al.*, 2000).

La spécificité antitumorale des virus oncolytiques peut prendre différentes formes : il y a d'une part l'entrée spécifique des virus dans les cellules tumorales et, d'autre part, la réplication sélective dans les tumeurs.

i. Entrée dans les cellules tumorales spécifiquement

La première méthode de spécificité repose en l'existence (ou la création) d'un tropisme d'entrée afin que le virus oncolytique n'infecte que les cellules tumorales : il s'agit par exemple d'un peptide fixé à la surface des virions qui sera reconnu par les cellules tumorales. On peut également modifier les protéines de surface des virus afin de les rediriger et spécifier leur infection sur des types cellulaires. La fibre du penton des adénovirus se lie au récepteur CAR (*coxsackie and adenovirus receptor*) présent sur divers types cellulaires ; il est exprimé de façon inversement proportionnelle à la malignité des cellules (Li Y *et al.*, 1999). Ainsi les adénovirus auront tendance à naturellement infecter les cellules normales. Néanmoins, ce rapport peut être inversé

en modifiant cette molécule. Des anticorps biconaux ont été construits pour lier la fibre à un récepteur très fortement exprimé sur les cellules transformées, par exemple le récepteur de croissance épidermique EGFR. Ce qui redirige les adénovirus vers les cellules transformées (Hemminki A *et al.*, 2001). Le gène correspondant à cet « adaptateur » protéique est transporté par le virus, il est exprimé par les cellules infectées, puis le produit lie d'une part la fibre du virus et d'autre part l'EGFR. Il en résulte une amplification de l'infection des cellules portant EGFR et une protection des cellules non tumorales exprimant CAR (Shayakhmetov DM *et al.*, 2002).

Une autre méthode consiste à créer des adénovirus avec une chimère des fibres des sérotypes 5 (plus couramment utilisé) et 3, qui se lie à un récepteur différent du CAR, ainsi les virus oncolytiques créés, sérotype 5 initial mais avec une fibre chimère, peuvent lyser des tumeurs déficientes en CAR (Rivera AA *et al.*, 2004).

ii. Réplication conditionnelle

Une autre approche de la spécificité des virus oncolytiques est de ne rendre leur réplication possible que dans les cellules tumorales : il existe, à ces fins, différentes méthodes.

- **Suppression de gènes indispensables à la réplication**

Il est possible de supprimer du génome viral des gènes dont le produit de l'expression est indispensable à la réplication dans les cellules normales mais dispensable dans les cellules tumorales. L'adénovirus oncolytique Onyx-015 représente un bon modèle de cette stratégie (Heise C *et al.*, 1997). Il s'agit d'un adénovirus mutant créé à partir d'une chimère des sérotypes 3 et 5, délété pour le gène *E1B-55kD*. Lorsque qu'un adénovirus sauvage infecte une cellule humaine normale, la protéine E1B-55kD, résultat de l'expression de *E1B-55kD*, inhibe la protéine p53 et empêche un suicide cellulaire, permettant alors la poursuite de l'infection virale. Ainsi, Onyx-015 ne peut pas échapper au suicide des cellules normales ; sa propagation est donc limitée dans les tissus à p53 active, car la cellule primo-infectée meurt

précocement (Nemunaitis J *et al.*, 2000). En revanche ce virus peut se répliquer et se propager dans les cellules ayant une défaillance dans la voie de p53, à savoir les cellules tumorales. Néanmoins il a été prouvé qu'Onyx-015 pouvait infecter et se répliquer dans des cellules tumorales ayant une voie p53 fonctionnelle (Goodrum FD *et al.*, 1998) ; par la suite, il a été démontré que ces cellules présentaient une p14ARF inactive (autre suppresseur de tumeur qui a un rôle dans la stabilisation de la p53) (Ries SJ *et al.*, 2000). Onyx-015 apparaît donc comme un agent oncolytique pour les cellules tumorales ayant une quelconque défaillance dans la voie d'activation de p53.

Une autre protéine adénovirale à fonction sélective est la protéine E1A qui inhibe l'action de la protéine pRB (comme E1B-55kD et p53) ainsi qu'un cofacteur de p53 (p300/CBP).

La protéine E4ORF6 inhibe aussi, mais à un moindre degré, la p53.

Ainsi les cellules tumorales possédant une défaillance dans la voie de signalisation p53 permettent la réplication virale et sont, par conséquent lysées.

- **Insertion d'un promoteur tumeur-dépendant**

Une autre approche consiste à insérer dans le génome viral un promoteur tumeur-spécifique pour contrôler l'expression de gènes nécessaires à la réplication. Ce concept a été développé sur un mutant adénoviral oncolytique pour lequel un promoteur dérivé du gène de l'alpha-fœtoprotéine (AFP) contrôle l'expression de E1A (Hallenbeck PL *et al.*, 1999). Ce mutant se réplique alors préférentiellement dans les cellules exprimant les activateurs naturels du promoteur de l'AFP. L'AFP est une protéine largement exprimée dans de nombreux tissus au cours du développement, mais à l'état adulte, on la retrouve dans des tumeurs hépatiques et intestinales. L'infection de ces tumeurs par un tel mutant engendre une survie des cellules tumorales diminuée de 50%, avec une toxicité minime pour les cellules n'exprimant pas l'AFP.

Il existe d'autres mutants construits pour obtenir des résultats similaires (Li Y *et al.*, 2001). Le mutant CV706 possède le promoteur de l'antigène spécifique de la prostate

(PSA) pour contrôler E1A et est utilisé dans des essais cliniques en phase I et II ; après injection directe dans la tumeur, une régression de 30 à 50% est observée après une semaine (De Weese TL *et al.*, 2001).

- **Autres modèles indépendants de réplication conditionnelle**

Le virus de la vaccine est capable d'infecter et de détruire les tissus humains très efficacement. Il est donc nécessaire de modifier le virus afin de cibler cette réplication et de la rendre aussi tumeur spécifique que possible, ceci dans le but d'obtenir un virus oncolytique à fort potentiel. L'enzyme thymidine kinase catalyse la phosphorylation de la thymidine en thymidine monophosphate, un précurseur de la synthèse des desoxyribonucléotides (notamment de thymidine triphosphate) nécessaire à la synthèse d'ADN et donc à la réplication cellulaire ou virale. Tandis que la thymidine kinase virale est nécessaire à la réplication du virus dans les cellules normales quiescentes, où la concentration de nucléotides est faible, cette enzyme n'est pas nécessaire dans les cellules tumorales, présentant une expression accrue de thymidine kinase et donc, une forte concentration de desoxyribonucléotides (Buller RM *et al.*, 1985). La réplication du virus de la vaccine, délété du gène de la thymidine kinase, est donc conditionnée aux cellules en division et donc en particulier aux cellules tumorales. Ce type de virus a démontré un ciblage tumoral dans de nombreux modèles animaux, notamment des modèles murins de tumeur de colon et de mélanome, des sarcomes de rat ainsi que des modèles tumoraux de lapin (Gnant MF *et al.* 1999 ; McCart JA *et al.*, 2000).

Le virus de la poliomyélite, neurotrophe, infecte les neurones moteurs de la moelle épinière. En remplaçant un élément de son génome, l'IRES (*internal ribosome entry site*), qui permet la traduction des ARNm viraux non coiffés, par un IRES de rhinovirus humain, sa spécificité neurale est perdue et le virus ne se propage plus que dans les cellules gliales cancéreuses (Gromeier M *et al.*, 2000).

Certaines souches virales de la lignée Edmonston du virus de la rougeole semblent sélectivement oncolytiques pour de nombreuses tumeurs lymphoïdes et non lymphoïdes. Cette capacité est due à une mutation d'une glycoprotéine virale d'attachement, lui permettant de se lier au facteur CD46, largement représenté à la surface des cellules cancéreuses (Anderson BD *et al.*, 2001).

Alors que la virothérapie oncolytique se focalisait sur l'utilisation de virus pour tuer des cellules tumorales directement, d'autres études se sont penchées sur la combinaison avec l'immunothérapie pour améliorer la réponse antitumorale. L'une de ces approches est d'utiliser des cellules tumorales infectées par un virus oncolytique (ce qui donne des oncolysats) afin d'augmenter l'antigénicité du tissu tumoral et par conséquent, provoquer une réponse immunitaire systémique contre des antigènes spécifiques de tumeur (Savage HE *et al.*, 1986). Nous nous intéresserons, ici, aux virus oncolytiques utilisés comme vecteur viraux pour apporter, en plus de leur activité oncolytique, une activité immunomodulatrice ou vaccinale.

II. Virus oncolytiques et immunostimulation

a. Stratégie

L'intérêt de cette approche est que l'expression de gènes de molécules d'immunostimulation dans les cellules tumorales, délivrés par des virus oncotropes, va stimuler l'inflammation et la réponse immunitaire contre ces cellules, et augmenter l'effet de ces virus oncolytiques. Des gènes codant pour le facteur de nécrose tumorale, (un ligand induisant l'apoptose), le smac (*second mitochondria-derived activator of caspases*), Fas-ligand, GM-CSF et mda/IL24 ont été incorporés dans des adénovirus oncolytiques. La régression tumorale a été observée sur des tumeurs établies dans des modèles animaux (Bristol JA *et al.*, 2003 ; Bernt KM *et al.*, 2002 ; Zhao L *et al.*, 2005 ; Nanda D *et al.*, 2005 ; Pei Z *et al.*, 2004 ; Liu XY *et al.*, 2005 ; Qiao J *et al.*, 2002 ; Li X *et al.*, 2007).

L'objectif est d'ajouter à la fonction oncolytique du virus une fonction immunostimulatrice permettant d'accroître la réponse antitumorale.

b. Exemple : utilisation d'un adénovirus à réplication conditionnelle porteur du gène mda-7/IL-24

(Luo J *et al.*, 2008)

Cette étude rapporte la création d'un vecteur adénoviral oncolytique dans lequel l'expression du transgène est contrôlée par un promoteur endogène, apparaissant lors de la réplication du virus.

Pour la plupart des constructions, les gènes thérapeutiques sont contrôlés par des promoteurs constitutifs exogènes ; par conséquent l'expression de ces gènes dans les tissus normaux peuvent induire des effets indésirables, même si les virus oncolytiques ne se répliquent finalement pas dedans. D'autre part, une expression inappropriée de gènes thérapeutiques pendant le cycle de réplication du virus peut affecter la réussite de cette réplication (Mi J *et al.*, 2001 ; Akbulut H *et al.*, 2003). Ainsi, les transgènes sous contrôle de promoteur exogène peuvent conduire à une expression imprévisible de gènes étrangers durant l'infection virale.

De récentes études ont exploré la possibilité de contrôler l'expression de transgènes par des promoteurs endogènes adénoviraux (Rivera AA *et al.*, 2004 ; Carette JE *et al.*, 2005 ; Hawkins LK *et al.*, 2001 ; Jin F *et al.*, 2005 ; Bauzon M *et al.*, 2003). Les gènes E3 ou gènes codant pour la fibre ne sont exprimés qu'au moment du cycle de réplication après l'infection par l'adénovirus (Young CS, 2003 ; Wold WS *et al.*, 1995) ; on peut donc s'attendre à ce que le transgène, placé à ce niveau, ne puisse être exprimé que dans les cellules tumorales si le virus oncolytique s'y réplique.

i. *Adenovirus oncolytiques*

Les adénovirus sont les virus modifiés les plus étudiés en tant que virus oncolytiques notamment les sérotypes 2 et 5. Comme nous l'avons vu, le premier virus à réplication conditionnelle utilisé chez l'Homme est un adénovirus, ONYX-015 ou

dl520 (Onyx Pharmaceuticals, Emeryville, CA). Ce virus est une chimère entre le sérotype 2 et 5, mutée dans la région E1B résultant dans la non expression de la protéine E1B-55kD. Il a été démontré que le virus ONYX-015 se réplique efficacement dans les cellules défectueuses pour la protéine p53 et permet la régression de xénogreffes de tumeurs humaines implantées dans des souris (Bischoff JR *et al.*, 1996 ; Rogulski KR *et al.*, 2000). Cependant de nombreuses études ont contredit le mécanisme sélectif de l'ONYX-015, basé sur la possibilité de réplication de ce virus dans des cellules avec une protéine p53 fonctionnelle (Goodrum FD *et al.*, 1998 ; Rothmann T *et al.*, 1998). D'autres études ont démontré une réplication du virus ONYX-015 dans des cellules primaires épithéliales, pour lesquelles les composants de la voie d'activation de p53 étaient actifs. La spécificité de réplication de l'ONYX-015 n'est donc pas corrélée avec l'activité de p53 mais est basée sur la capacité supérieure des tumeurs à exporter les ARN tardifs du virus dans le cytoplasme permettant ainsi une réplication efficace de l'ONYX-015 (O'Shea CC *et al.*, 2004).

En s'appuyant sur les données cliniques du virus ONYX-015, l'efficacité du virus H101 (Sunway ; Shangai, Chine), un virus également délété du gène E1B-55K, fut testé par injection intratumorale à des patients présentant un cancer de la tête et du cou ou des carcinomes du pharynx (Yuan ZY *et al.*, 2003). Les résultats furent quasiment identiques à ceux du virus ONYX-015 (Lu W *et al.*, 2004). Cependant, une phase III comparant la chimiothérapie et la combinaison chimiothérapie/H101 dans le cancer du cou et de la tête, a démontré une réponse supérieure statistiquement significative pour la combinaison (Xia ZJ. *et al.*, 2004). Les résultats de survie et de bénéfice clinique à long terme ne sont toujours pas disponibles, cependant H101 a reçu une autorisation de mise sur le marché en 2005, en Chine, dans une indication des cancers de la tête et du cou.

Dans cette étude, l'adénovirus oncolytique utilisé est l'AdCN103 ayant pour promoteur de E1A délété de CR2 celui de hTERT(Zhang W *et al.*, 2007). Ainsi ce vecteur ne se réplique que dans les cellules tumorales présentant une sur expression de hTERT et une dysfonction du rétinoblastome. Rappelons que la hTERT est la sous-unité catalytique de l'holoenzyme télomérase. Il s'agit d'une transcriptase reverse normalement exprimée dans les cellules souches et la majorité des cancers. Il s'agit

donc d'un virus oncolytique à réplication conditionnelle pour qui deux conditions doivent être réunies, ce qui augmente la sécurité de son utilisation.

ii. Le transgène : *mda-7/IL24*

Il a été démontré que l'interleukine 24, appelée également *melanoma differentiation associated gene 7* (*mda-7*), exerce une importante activité antitumorale. En effet, le *mda-7* est un gène suppresseur de tumeur multifonctionnel, qui induit l'apoptose des cellules tumorales par de nombreux mécanismes (Fisher PB *et al.*, 2003 ; Saeki T *et al.*, 2000 ; Su ZZ *et al.*, 1998 ; Su Z *et al.*, 2001 ; Lebedeva IV *et al.*, 2002 ; Madireddi MT *et al.*, 2000 ; Sauane M *et al.*, 2003 ; Sauane M *et al.*, 2004) mais pas dans les mélanocytes normaux, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales de prostate et mammaires et les fibroblastes de la peau (Saeki T *et al.*, 2000 ; Su ZZ *et al.*, 1998 ; Lebedeva IV *et al.*, 2002 ; Madireddi MT *et al.*, 2000). De plus, il présente des fonctions antiangiogénique et immunostimulatrice. On le nomme également IL-24 en raison de ses fonctions immunostimulatrices et de son homologie avec l'IL-10 (Nishikawa T *et al.*, 2004 ; Saeki T *et al.*, 2002 ; Caudell EG *et al.*, 2002). Le gène *mda-7* code pour une protéine de 206 acides aminés avec une masse moléculaire de 23,8kDa (Mhashilkar AM *et al.*, 2001).

Pour ses propriétés très intéressantes, ce gène a très souvent été utilisé dans des recherches de lutte antitumorale mettant en œuvre des virus oncolytiques. Par exemple, Zhao L *et al.* ont fait porter ce transgène à un adénovirus ZD55 et ont prouvé son efficacité antitumorale sur un modèle animal de cancer du colon (Zhao L *et al.*, 2005). En 2006, c'est dans un modèle de cancer ovarien qu'est testé l'efficacité de ce transgène porté par un adénovirus oncolytique (Mahasreshti PJ *et al.*, 2006).

iii. Résultats

● Construction des vecteurs oncolytiques

Deux vecteurs oncolytiques sont construits, à partir de l'AdCN103 ;

- AdCN205-EGFP : la région 6,7K/gp19k du gène E3 est remplacée par le gène EGFP

(*enhanced green fluorescent protein*) qui est un marqueur fluorescent ;

- AdCN205-IL-24 : le gène *mda-7/IL-24* remplace le même gène que précédemment (fig 20)

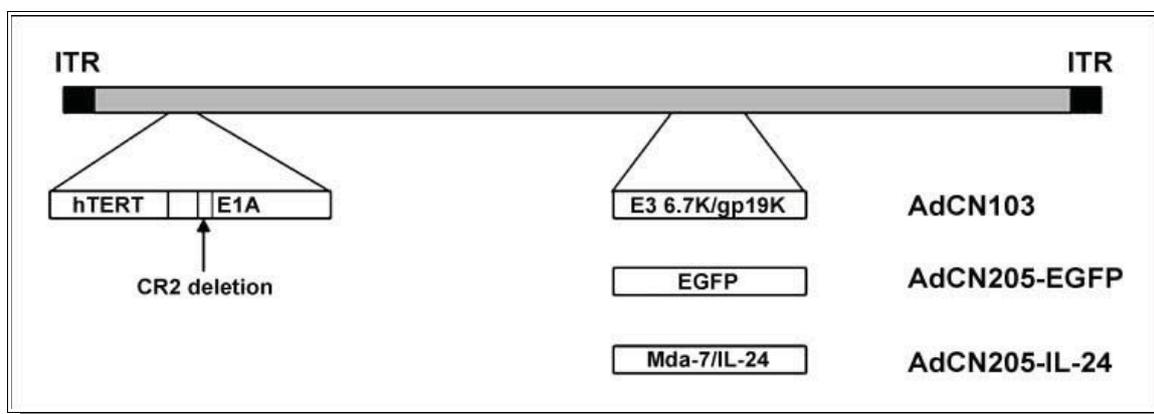


Figure 20 : Structure schématique de AdCN103, AdCN205-EGFP, AdCN205-IL-24 (Luo J *et al.*, 2008)

Ainsi, pour ces deux vecteurs, l'expression des transgènes dépend du promoteur endogène du gène E3.

- **Expression des transgènes après infection des cellules par les virus**

Des cellules tumorales (SW620 et BEL7404) et normales (QSG et MRC5) sont infectées par AdCN205-IL-24 pour évaluer la cinétique de l'expression d'IL-24. Les données montrent que l'IL-24 peut être détectée 6 heures après l'infection des cellules tumorales, avec une augmentation constante de cette expression jusqu'à 24h, puis maintenue à un haut niveau jusque 96h. En revanche, aucune expression d'IL-24 n'est détectable jusqu'à 72h après l'infection dans les cellules normales ; après, de faibles niveaux d'IL-24 peuvent être perçus (Fig 21.A) . En revanche, des cinétiques similaires sont observables dans les cellules normales et tumorales infectées par un adénovirus porteur du gène de l'IL-24, contrôlé par un promoteur de cytomégalovirus Ad-IL24 (Fig 21.B).

Il faut noter que le niveau d'expression d'IL-24 est quatorze fois plus élevé dans les cellules tumorales infectées par AdCN205-IL-24 que celles infectées par Ad-IL-24.

Le haut niveau d'expression de l'EGFP est seulement observé dans les cellules tumorales accompagné d'effets cytopathiques, alors que dans les cellules normales, on observe peu ou pas de EGFP après l'infection par AdCN205-EGFP (Fig 21.C).

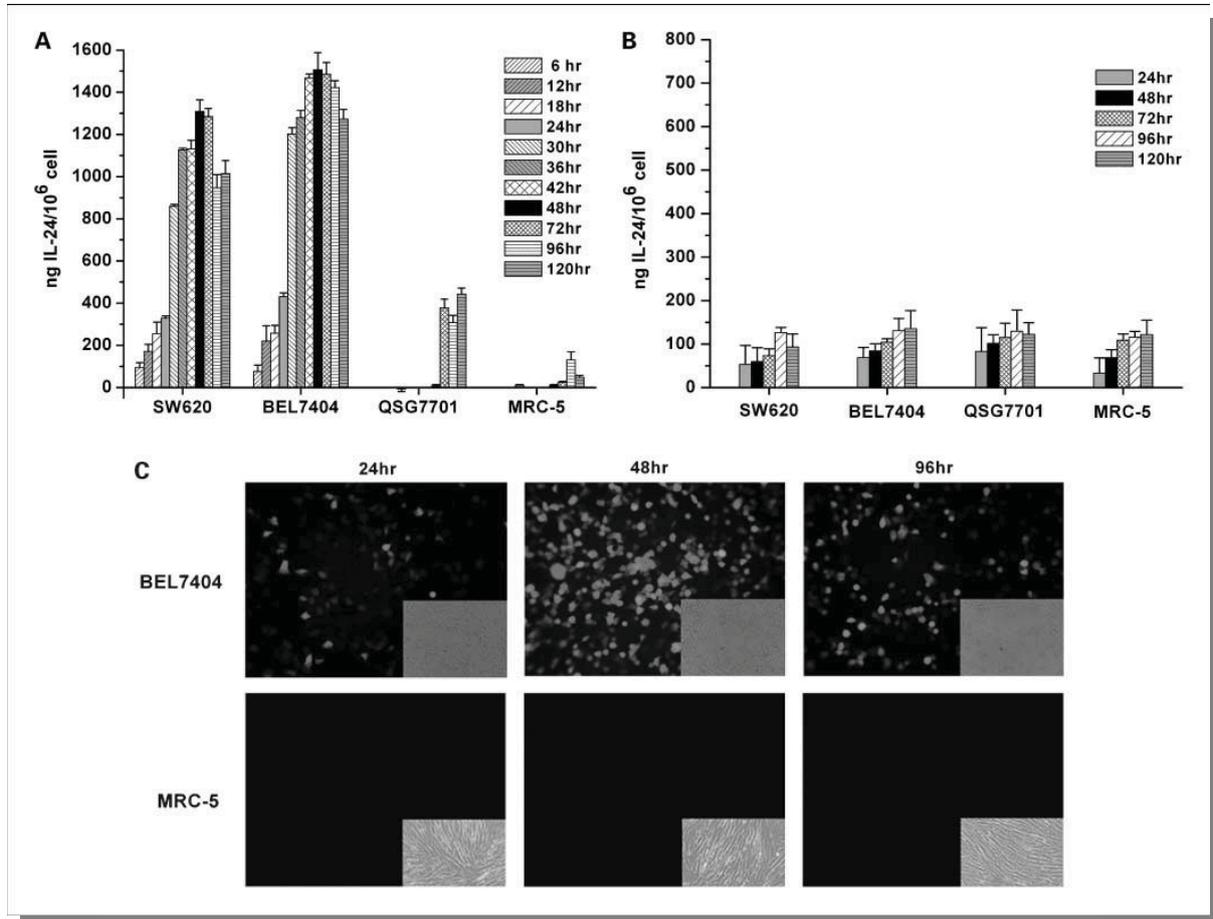


Figure 21 : Expression du transgène dans les cellules tumorales (SW620 et BEL7404) et cellules normales (QSG7701 et MRC-5) après infection par des adénovirus oncolytiques AdCN205-IL-24 , Ad-IL24 ou AdCN205-EGFP

(Luo J *et al.*, 2008)

A. Niveau d'IL-24 dans les cellules infectées par AdCN205-IL-24.

B. Niveau d'IL-24 dans les cellules infectées par Ad-IL24.

C. Résultats de fluorescence obtenue de cellules BEL7404 et MRC5 infectées par AdCN205-EGFP. (grossissement 200).

- **Réplication conditionnelle des vecteurs adénoviraux oncolytiques *in vitro***

La descendance des virus est testée afin de savoir si la délétion de E3 6.7K/gp19K et l'insertion du transgène *mda-7/IL-24* a altéré la capacité de réplication virale. Comme le montre la figure ci-après, la production virale pour les AdCN205-EGFP et AdCN205-IL-24 est identique à celle observée pour AdCN103 et Ad-Wt (adénovirus sauvage) dans les cellules tumorales. La production virale d'Ad-IL-24 est significativement plus faible que les virus oncolytiques dans les cellules tumorales (Fig 22).

La production de virus AdCN205-EGFP, AdCN205-IL-24 et AdCN103 dans les cellules normales est plus élevée que la production de virus Ad-IL-24 mais bien moins que pour le virus sauvage. Ainsi le remplacement du gène E3 6.7K/gp19K par le gène thérapeutique IL-24 ou le gène marqueur EGFP n'interfère pas avec la réplication et production virale dans les cellules tumorales.

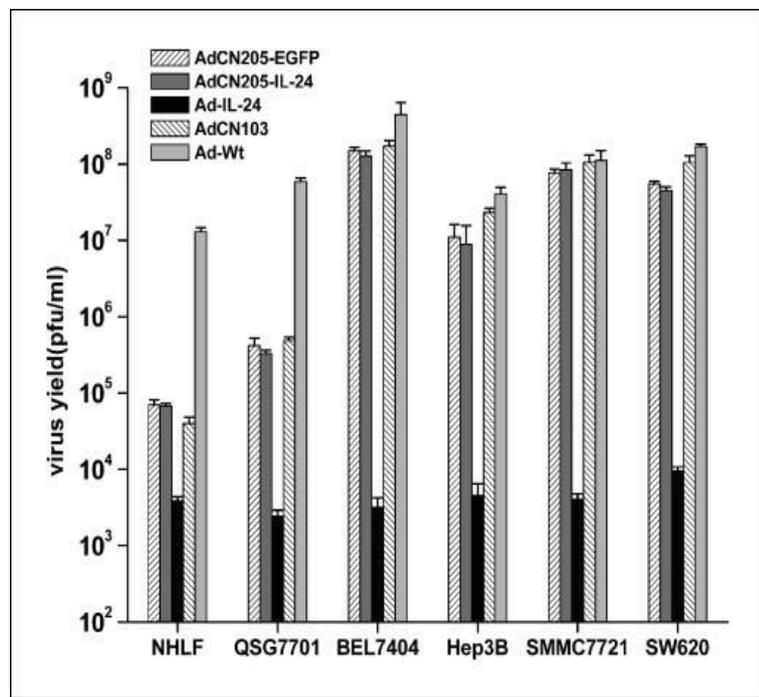


Figure 22 : Réplication conditionnelle de vecteurs adénoviraux oncolytiques in vitro

(Luo J *et al.*, 2008)

- **Cytotoxicité des vecteurs adénoviraux oncolytiques dans les cellules tumorales *in vitro***

Pour déterminer la capacité des vecteurs oncolytiques portant *mda-7/IL-24* à détruire les cellules tumorales, des évaluations de cytotoxicité sont effectuées après l'infection par les virus oncolytiques.

Ad-IL-24, l' adénovirus à réplication déficiente induit une cytotoxicité faible sur les cellules tumorales, alors que AdCN205-EGFP et Ad-Wt induisent une cytotoxicité indéniable. L'effet de AdCN205-IL-24 est plus important que le virus sauvage ou AdCN205-EGFP. Par ailleurs, AdCN205-EGFP, AdCN205-IL-24 et Ad-IL-24 n'induisent pas de cytotoxicité dans les cellules normales.

Ces résultats suggèrent que AdCN205-EGFP et AdCN205-IL-24 peuvent se répliquer sélectivement dans les cellules tumorales et le fait d'apporter IL-24 révèle une meilleure efficacité pour tuer les cellules tumorales.

- **Activité antitumorale de vecteurs adénoviraux oncolytiques dans un modèle animal avec des tumeurs établies BEL7404**

Afin de connaître le potentiel antitumoral des vecteurs, des souris nudes inoculées de cellules (1.10^6) BEL7404 (cellules d'hépatome), reçoivent des injections i.t. de Ad-IL-24, AdCN205-EGFP, AdCN205-IL-24 et Ad-Wt. Les animaux témoins recevant du PBS présentent une croissance tumorale progressive. Le traitement avec Ad-IL-24 donne une inhibition mineure de la croissance tumorale. Les Ad-Wt et AdCN205-EGFP exercent une activité antitumorale forte similaire, alors que le traitement avec l' AdCN205-IL-24 donne une plus forte inhibition de la croissance tumorale très significativement différente de celles obtenues par Ad-Wt et AdCN205-EGFP. Deux des huit animaux traités avec ce vecteur présentent une régression

complète (Fig 23.A).

Le traitement avec AdCN205-IL-24 conduit à une survie à long terme (Fig 23. B).

Les analyses immunohistochimiques ont montré que l'expression de IL-24 était observable seulement dans des sections de tumeurs provenant d'animaux traités avec Ad-IL-24 et AdCN205-IL-24. Seulement la densité observée d'IL-24 est plus importante pour les animaux traités par AdCN205-IL-24.

Les analyses pathologiques ont révélé des aires de nécrose plus ou moins importantes selon le traitement reçu. Le traitement avec l'AdCN205-IL-24 donne les zones de nécrose tumorale les plus importantes.

Afin de vérifier que la réplication tumorale ne s'effectue que dans les cellules tumorales, des sections de foie ont été prélevées afin de détecter les éventuelles présences d'hexons adénoviraux. Aucun signal d'hexon n'a été détecté sauf dans les sections de foie provenant d'animaux traités avec le virus sauvage. Cette étude met donc en évidence que le traitement avec des vecteurs oncolytiques adénoviraux, n'induit pas de réplication virale dans les cellules normales.

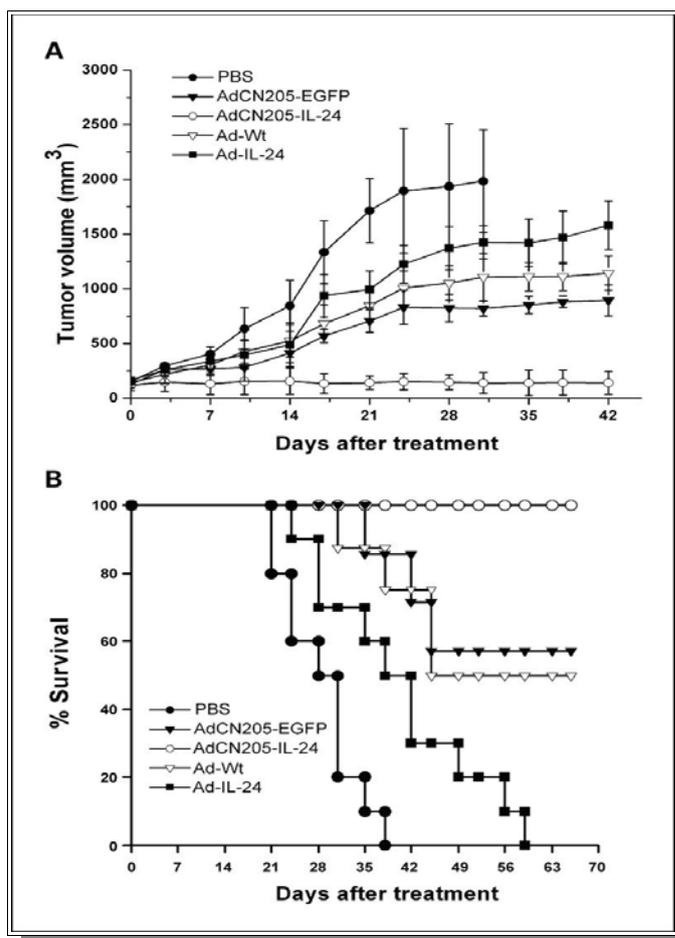


Figure 23 : Activité antitumorale de vecteurs oncolytiques dans des tumeurs établies dans un modèle animal

(Luo J et al., 2008)

- **Conclusions de cette étude**

En raison de la complexité génétique et phénotypique des cellules cancéreuses et de leurs multiples anomalies (El-Serag HB *et al.*, 2007), il apparaît évident qu'un simple adénovirus oncolytique seul est insuffisant pour une éradication complète des tumeurs malignes. Armer un virus oncolytique avec un gène thérapeutique est devenu une voie importante dans la lutte antitumorale (Hermiston TW *et al.*, 2002). Des essais cliniques mettant en œuvre des adénovirus défectifs pour la réplication et exprimant IL-24 ont prouvé leur innocuité et des réponse partielles (Cunningham CC *et al.*, 2005 ; Tong AW *et al.*, 2005).

Cette étude présente donc une approche antitumorale avec deux stratégies de

thérapie génique : un virus oncolytique ne se répliquant que dans le tissu tumoral et l'expression de cytokine IL-24 induisant l'apoptose, molécule immunostimulatrice et anti-angiogénique. L'expression du transgène dépendant entièrement du bon déroulement de la réplication du virus oncolytique (promoteur endogène de E3), il apparaît crucial que la spécificité du vecteur soit réelle. C'est pourquoi l'AdCN103 est choisi : il ne se réplique qu'en présence de hTERT et une dysfonction du rétinoblastome.

Les résultats montrent :

- AdCN205-IL-24 exerce une cytotoxicité dans les cellules tumorales plus importantes que Ad-Wt ou AdCN205-EGFP ;
- AdCN205-EGFP et Ad-Wt exercent la même cytotoxicité à l'égard des cellules tumorales ;
- AdCN205-IL-24 et AdCN205-EGFP n'induisent pas d'effet cytopathique sur les cellules normales ;
- une puissante activité antitumorale est observable dans le modèle animal ;
- la présence de transgène n'affecte pas la capacité des virus oncolytiques à se répliquer et exercer leur effet oncolytique ;
- l'addition de l'expression d' IL-24 a l'activité oncolytique provoque la synergie des deux stratégies antitumorales.

Ainsi ces données indiquent que le nouveau vecteur AdCN205-IL-24 se présente comme un vecteur puissant et non nuisible pour la thérapie anticancéreuse.

c. Bilan et perspective

Les études montrant que des virus oncolytiques armés de cytokine ou molécule de co-stimulation augmentent significativement l'activité antitumorale sont nombreuses ; en effet, il a été démontré une augmentation de la réponse antitumorale *in vitro* et *in vivo* lorsque un adénovirus oncolytique porte un gène d'immunostimulation comme le *GM-CSF* (Bristol JA *et al.*, 2003) ou un IFN humain (Zhang JF *et al.*, 1996) par rapport au virus oncolytique seul.

De même qu'avec les vecteurs non répliatifs, il est possible de faire exprimer

aux virus oncolytiques plusieurs transgènes dans le but d'améliorer l'effet obtenu. L'IL-12 et B7-1 portés par un adénovirus oncolytique ont augmenté la réponse antitumorale dans un modèle murin (Lee YS, *et al.*, 2006). Une autre étude a mis en évidence l'amélioration de la réponse immunitaire induite par un adénovirus oncolytique porteur des gènes *GM-CSF* et *B7-1* avec une régression plus importante des tumeurs par rapport à l'utilisation d'un vecteur adénoviral non-répliquatif porteur de ces mêmes gènes (Choi KJ *et al.*, 2006). Des virus oncolytiques dérivés de l'HSV-1 utilisés en tant que vecteur de l'IL-4 (Andreansky S *et al.*, 1998) ou l'IL-12 (Parker JN *et al.*, 2000 ; Wong RJ *et al.*, 2001) ont démontré une importante amélioration de la réponse antitumorale en comparaison avec les mêmes virus oncolytiques non porteurs de cytokines.

Nombreux sont les essais pré cliniques de cette double stratégie mis en place sur des modèles animaux, alors que les essais cliniques humains se font plus rares. En avril 2009 ont été publiés les résultats d'un essai clinique de phase I, étudiant un adénovirus oncolytique porteur du *GM-CSF* sur des patients atteints de cancers de la tête et du cou. L'adénovirus utilisé est KH901 : il se réplique dans les cellules tumorales exprimant la télomérase, et exprime *GM-CSF*. Le traitement en i.t. est bien toléré avec pour principal effet toxique des symptômes grippaux, et est associé à une activité biologique (Chang J *et al.*, 2009).

Un essai clinique de phase I a été réalisé pour le traitement intra-tumoral de mélanomes par une souche Wyeth de virus de la vaccine délété pour le gène de la thymidine kinase et exprimant le gène immunostimulateur *GM-CSF* (Mastrangelo MJ *et al.*, 2000). L'ARNm du *GM-CSF* et une réplication virale ont été détectés dans la majorité des biopsies. L'expression de gènes viraux était encore détectable 7 mois après le début du traitement. Des réponses tumorales objectives ont été observées chez 5 des 7 patients. De plus, 4 patients présentant des métastases dermiques non injectées ont montré des régressions au niveau de ces métastases infiltrées par des cellules T. Deux patients ont connu une réponse complète locale et/ou distante et n'ont plus de mélanome 1,5 et 6 ans après le traitement (Liu TC *et al.*, 2007).

Une autre stratégie consiste à charger les virus oncolytiques avec des antigènes spécifiques de tumeur dans le but d'obtenir en plus de l'oncolyse viro-induite, une réponse immunitaire spécifique antitumorale.

III. Virus oncolytiques et vaccination

Les cancers à un stade avancé et métastasés, sont difficiles à traiter et ne se guérissent que rarement ; le constat d'échec des thérapies actuelles pousse la recherche à s'orienter dans de nombreuses voies pour tenter de contrôler l'évolution de la maladie. L'utilisation de virus oncolytiques en tant que vecteur d'antigène tumoral représente une stratégie prometteuse.

a. Stratégie

Il s'agit d'utiliser des virus oncolytiques en tant que vecteur de gènes codant pour des TAA ; le principe est le même qu'avec les vecteurs viraux n'ayant pas d'activité oncolytique, mais ici c'est l'addition de deux stratégies thérapeutiques qui est mise en place.

Des virus oncolytiques codant pour des antigènes spécifiques de tumeurs ont été utilisés dans de nombreuses stratégies vaccinales antitumorales afin de provoquer une réponse immunitaire, dans des essais précliniques.

a. Exemple : utilisation du virus de la vaccine recombinant en tant que vaccin antitumoral

(Chuang C *et al.*, 2009)

i. Virus de la vaccine : un virus oncolytique

Le virus de la vaccine est surtout connu pour le rôle qu'il a joué comme vaccin dans l'éradication de la variole humaine. Ce virus présente des caractéristiques très intéressantes pour son utilisation en tant qu'agent thérapeutique anti-cancer :

- il est capable d'infecter, de se répliquer et de détruire de nombreux types cellulaires humains ;
- il cible de façon naturelle les cellules tumorales ;
- il possède un large génome permettant l'insertion de grand fragment d'ADN ;
- les avancées technologiques ont permis la modification du virus aux niveaux génomique et phénotypique ;
- il possède une grande immunogénicité capable d'améliorer l'efficacité de la réponse immunitaire anti-cancéreuse ;
- son profil pathogène est faible et connu suite à son utilisation dans l'éradication de la variole.

Toutes ces caractéristiques en font un vecteur très étudié dans le cadre de thérapies anti-cancéreuses. Historiquement, ce vecteur a été utilisé, dans un premier temps, en tant que transporteur d'antigènes tumoraux ou de molécules immunostimulatrices, dans le développement de vaccins anti-cancéreux. Plus récemment, le virus de la vaccine a été utilisé en tant que vecteur oncolytique grâce à sa réplication dite « tumeur spécifique ». Cette dernière propriété permet ainsi l'utilisation de ce virus en tant que vecteur délivrant des gènes thérapeutiques au sein de la tumeur.

Le virus de la vaccine a tout d'abord été utilisé dans le traitement du cancer en tant que virus sauvage. Des injections intra-tumorales ont démontré une efficacité significative et reproductible dans de nombreux essais cliniques (Milton GW, 1964). Ces réponses furent, dans certains cas, durables, complètes et distantes du site d'injection. Les résultats de trois premiers essais cliniques sur 44 patients atteints de mélanome métastatique ont montré des réponses complètes sur 25 patients au niveau du site d'injection (Mastrangelo MJ *et al.*, 2000 ; Hunter-Craig I *et al.*, 1970 ; Drabick JJ *et al.*, 2001). Ce traitement a permis la disparition complète de la maladie sur 6 patients après 2 ans. De même, un rapport concernant 4 patients atteints de mélanome avancé décrit une rémission complète de la maladie après 1an et demi, 2 et 6 ans chez 3 patients. De plus, l'administration de virus de la vaccine dans la vessie de patients atteints d'un cancer superficiel a montré une absence de toxicité et une

réplication du virus dans les tumeurs (Gomella LG *et al.*, 2001).

Des réponses induites après traitement par voie systémique ont été décrites pour 3 patients, avec des réponses objectives dans les poumons de 2 patients présentant des métastases d'adénocarcinomes rénaux et du poumon (Arakawa S Jr *et al.*, 1987). Ces essais cliniques n'ont pas été poursuivis par crainte d'une trop forte toxicité. Le développement des techniques de biologie moléculaire et de recombinaison a permis d'améliorer l'efficacité et l'innocuité de l'utilisation du virus de la vaccine.

Des virus recombinants de la vaccine à réplication conditionnelle ont donc été construits sur le modèle des mutants de HSV, c'est-à-dire en inactivant, principalement, le gène de la thymidine kinase. Puhlmann *et al.* ont alors démontré que la réplication d'un virus de la vaccine, déficient pour le gène tk, est très spécifique des cellules cancéreuses, avec une cinétique de réplication supérieure de plusieurs ordres de grandeur, à celle des cellules normales (Puhlmann M *et al.*, 2000). Ce même groupe a développé aussi un virus de la vaccine doublement muté pour le gène tk et le gène *VGF*. Le VGF est une protéine sécrétée qui stimule les cellules voisines, pour qu'elles entrent dans un cycle prolifératif, en mimant l'EGF et donc en activant la voie de EGFR. Ce double mutant a montré une spécificité tumorale accrue après une injection par voie systémique en comparaison au virus délété pour le gène tk en conservant une activité antitumorale très efficace sur des tumeurs implantées dans des souris (McCart JA *et al.*, 2000). De nombreux autres gènes impliqués dans la réplication, l'infection ou la diffusion virales ont été délétés pour diminuer la toxicité du virus et améliorer sa spécificité tumorale. Par exemple, des mutants pour les gènes *SPI-1* et *SPI-2*, codant des inhibiteurs de sérine-protéase nécessaire à une bonne multiplication du virus, ont montré une réplication très spécifique de la tumeur dans des modèles animaux (Guo ZS *et al.*, 2005).

ii. Le transgène

Le transgène est le gène de l'ovalbumine (OVA).

iii. Résultats

Cette étude part du principe que des souris porteuses de tumeur, primo-vaccinées avec de l'ADN codant pour un antigène étranger immunogène, comme l'ovalbumine, suivi d'une injection intra-tumorale de virus de la vaccine codant pour le même antigène, peuvent générer des réponses antitumorales améliorées et par l'effet oncolytique et l'immunité spécifique créée. L'antigène OVA exprimé par les cellules tumorales infectées par la vaccine va servir de cible pour les cellules T CD8+ spécifiques de l'OVA. De plus, l'injection en i.t. de vaccine codant pour OVA peut générer de l'inflammation et des « signaux de danger » qui peuvent recruter des cellules immunitaires, comme les cellules T spécifiques de OVA générées par la primo vaccination avec l'ADN. La mort de cellules tumorales causée par le virus de la vaccine oncolytique aussi bien que par les cellules T CD8+ spécifiques de l'OVA permet la libération d'autres TAA, qui peuvent être présentés par des CD et de nouveau engendrer l'activation d'une immunité tumeur-spécifique. Ce qui pourrait conduire à des effets thérapeutiques systémiques antitumoraux contre des cellules tumorales non infectées par la vaccine (dissémination d'épitopes). Cette stratégie pourrait être plus efficace et plus applicable pour générer une immunité antitumorale spécifique et systémique.

- **Les souris porteuses de tumeur, primo vaccinées avec l'ADN codant un antigène puis traitées en i.t. par une injection de vaccine codant pour le même antigène présentent des effets thérapeutiques antitumoraux significatifs**

Il avait déjà été montré que l'injection i.t. de vaccine codant pour un gène marqueur, comme la luciférase, peut induire une importante expression de luciférase dans la tumeur, ce qui indique que l'injection i.t. de vaccine conduit à une infection significative des cellules tumorales. Pour déterminer les effets générés par le traitement énoncé plus haut, des cellules tumorales B16 (cellules tumorales de mélanome de souris) sont implantées à plusieurs groupes de souris C57BL/6.

Ensuite, celles-ci reçoivent une injection d'ADN : pour le contrôle, le plasmide seul pcDNA3 ; les autres reçoivent un plasmide codant pour OVA (p-OVA). Une semaine plus tard, les souris sont traitées par voie i.t. soit avec la vaccine sauvage (Vac-WT), soit la vaccine codant pour OVA.

La figure 24.A représente schématiquement le traitement effectué.

Comme on peut le voir en 24.B, les souris primo vaccinée avec l'ADN codant pour OVA, puis traitées par l'injection i.t. de vaccine codant pour OVA, présentent la meilleure réponse thérapeutique antitumorale par rapport aux autres méthodes. La figure 24.C démontre que, par ailleurs, le traitement permet une amélioration de la survie.

Par la suite, la même approche a été testée avec un autre modèle tumoral, les cellules TC-1. Les souris se voient donc injecter des cellules tumorales TC-1, puis primo vaccinées avec le plasmide de contrôle pcDNA3 ou p-OVA. Une semaine plus tard, elles sont traitées avec la vaccine sauvage ou recombinante par voie i.t. ; les souris témoins reçoivent du PBS (Fig 25).

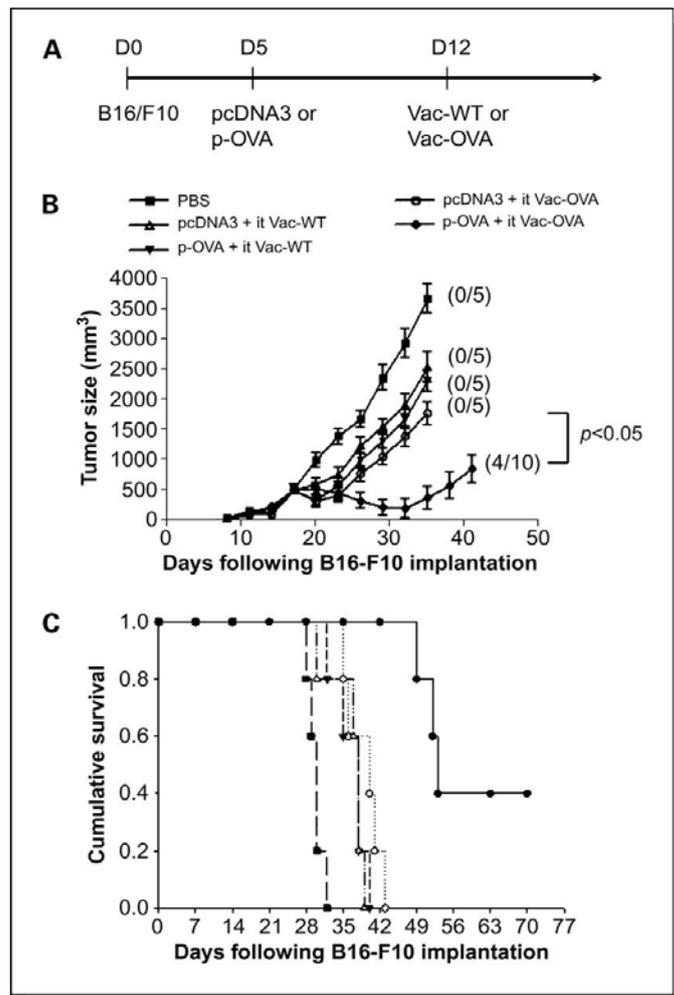


Figure 24 : Traitement in vivo sur des tumeurs B16

A. Représentation schématique du protocole.

B. Évolution de la taille des tumeurs en fonction du temps.

C. Pourcentage de survie en fonction du temps.

(Entre parenthèses : nombre de souris ayant complètement éliminé la tumeur)

(Chuang C *et al.*, 2009)

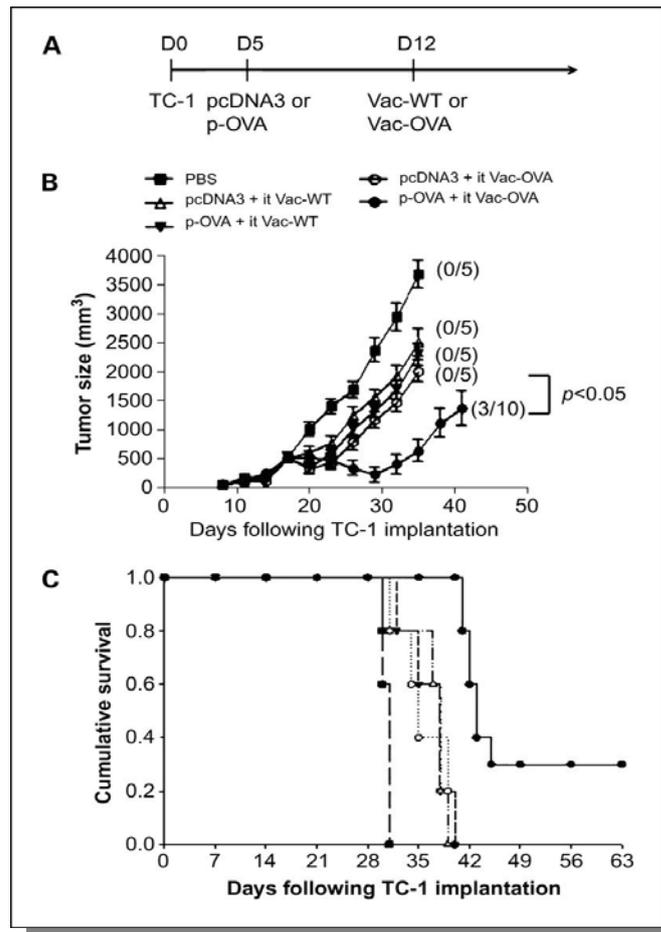


Figure 25 : traitement in vivo sur des tumeurs TC-1

A. Représentation schématique du protocole.

B. Évolution de la taille des tumeurs en fonction du temps.

C. Pourcentage de survie en fonction du temps.

(Entre parenthèses : nombre de souris ayant complètement éliminé la tumeur)

(Chuang C *et al.*, 2009)

Cette figure représente en A le protocole de l'expérience. Encore une fois un meilleur effet thérapeutique et une meilleure survie sont obtenus avec les souris ayant reçu une primo vaccination d'ADN recombinant, suivi d'une injection i.t. de vaccine codant pour le même antigène que l'ADN (B et C).

- **Les souris porteuses de tumeur, primo vaccinées avec l'ADN codant un antigène puis traitées en i.t. par une injection de vaccine codant pour le même antigène présentent l'activation d'un nombre important de cellules T CD 8+ spécifiques de cet antigène**

Les groupes formés sont les mêmes que précédemment : un groupe primo-vacciné avec un plasmide sans antigène, l'autre avec le p-OVA, puis vaccinés soit avec la vaccine sauvage, recombinante (OVA) ou PBS (témoin négatif).

Sept jours après la vaccination des souris, des cellules de rate et de tumeurs sont prélevées et sont caractérisées par la présence de cellules T CD8+ spécifiques de OVA. Des analyses par cytométrie de flux montrent que les souris traitées avec p-OVA puis Vac-OVA en i.t. génèrent de façon significative un grand nombre de cellules T CD8+ spécifiques de OVA aussi bien dans la rate que dans les tumeurs.

L'expérience a été effectuée, selon des protocoles équivalents, dans un autre modèle tumoral (TC-1) avec un système antigénique différent : la protéine de papillomavirus E7. Les résultats se sont avérés similaires.

Ainsi les données indiquent que le traitement de souris porteuses de tumeurs vaccinées par de l'ADN codant pour un antigène donné suivi de l'injection i.t. de vaccine codant pour le même antigène conduit à la réponse cellulaire T CD8+ spécifique de l'antigène la plus forte dans les tumeurs et la rate.

Les réponses immunes cellulaires T CD4+ ont également été mesurées ; il s'avère qu'aucune différence significative n'est observée dans la rate, par contre au niveau de la tumeur, la réponse T CD4+ est bien plus importante dans le protocole énoncé précédemment que dans les autres.

Ainsi, le traitement à base de p-OVA suivi de l'injection i.t. conduit à une augmentation des réponses à cellules T CD4+ dans les tumeurs.

En menant des expériences de réduction de cellules T CD8+, ou CD4+, il a été montré que ces deux types de cellules jouent un rôle important dans les effets antitumoraux.

- Le traitement avec la vaccine codant OVA permet, d'une part de tuer les cellules tumorales et, d'autre part, de rendre les cellules tumorales plus susceptibles de se faire tuer par des cellules T spécifiques de OVA

Afin de déterminer si le traitement des cellules tumorales avec Vac-OVA peut les rendre susceptibles d'être tuées aussi bien par les CD8+ que par l'oncolyse virale, un essai cytotoxique *in vitro* est mis en place sur des cellules tumorales TC-1 exprimant la luciférase. Les cellules TC-1/luc sont traitées à J1 avec Vac-OVA ou Vac-WT. Ensuite, elles sont mises en présence, ou non de cellules T CD8+ spécifiques de OVA (OT-1T) le 2ème jour (Fig 26.A). Quatre heures plus tard, on peut évaluer la réponse CTL contre les cellules tumorales TC-1 grâce au système d'image de bioluminescence (mesure de l'expression de la luciférase) (Fig 26.B).

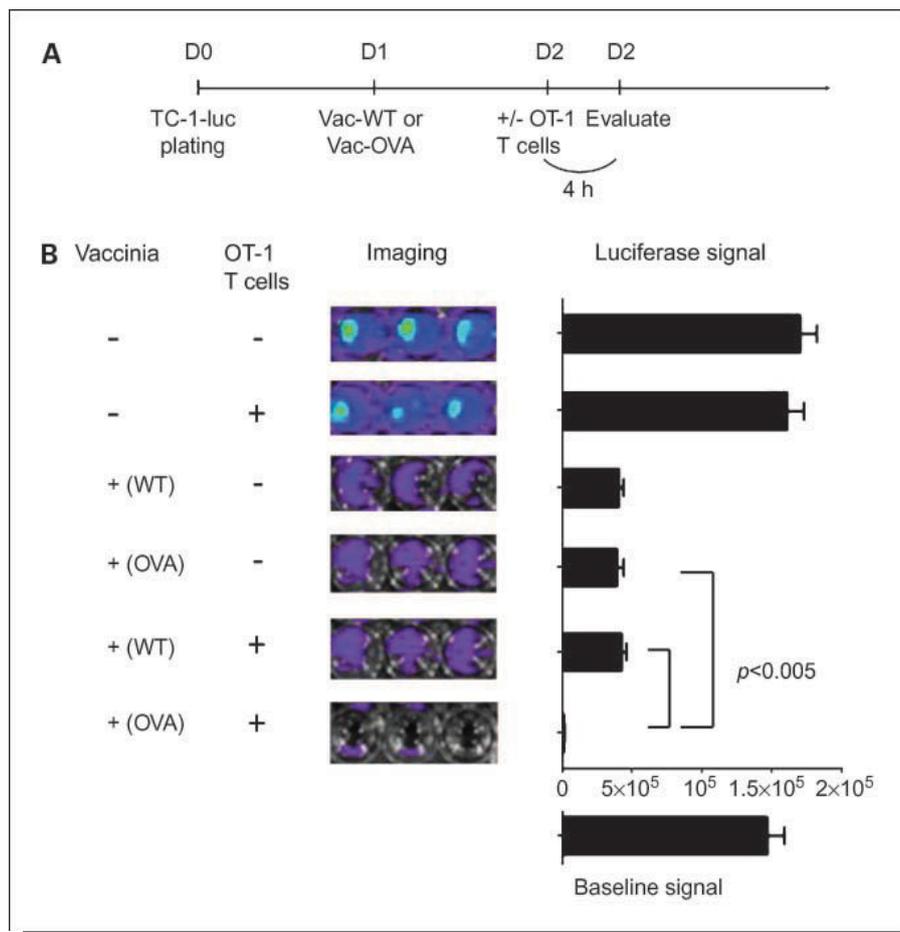


Figure 26 : Épreuve cytotoxique *in vitro* (Chuang C *et al.*, 2009)

Le degré de mortalité des cellules tumorales est indiqué par la diminution de l'activité lumineuse. Comme on peut le voir en B, les cellules tumorales incubées avec Vac-WT ou Vac-OVA seule montrent une diminution significative de l'activité de la luciférase, indiquant l'activité oncolytique de la vaccine. De plus, l'activité la plus faible en luciférase est observée chez les cellules TC-1 traitées avec Vac-OVA en association avec les cellules OT-1T, mais pas avec Vac-WT. Ces données suggèrent que l'augmentation de la lyse tumorale est due à la réponse cellulaire cytotoxique médiée par les cellules T CD8+ spécifiques de OVA. Ainsi, le traitement des cellules tumorales par Vac-OVA et les cellules OT-1T conduit à une lyse tumorale par la combinaison de l'oncolyse et de la réponse spécifique.

- **Conclusion de cette étude**

Cette étude montre que les souris porteuses de tumeurs primo vaccinées avec de l'ADN codant pour OVA puis injectées par voie i.t. de vaccine exprimant OVA, génèrent de meilleurs effets thérapeutiques antitumoraux dans deux modèles tumoraux, aussi bien B16 que TC-1. De plus, l'induction d'un niveau important de cellules T CD8+ spécifiques de OVA est montrée. Par ailleurs, les souris traitées par l'ADN puis la vaccine présentent le meilleur contrôle de croissance tumorale et leur survie est améliorée.

Le traitement avec Vac-OVA rend les cellules tumorales et les cellules stromales environnantes sensibles à l'oncolyse virale et à l'action des cellules T CD8+ spécifiques de OVA, ce qui augmente les effets thérapeutiques. En effet, l'étude prouve également que ce traitement a un effet cytotoxique sur les cellules non tumorales CD31+, vraisemblablement les cellules endothéliales et d'autres types cellulaires dans le stroma tumoral. Or la destruction du stroma tumoral peut contribuer aux effets antitumoraux. D'autres études ont suggéré que la manipulation du micro environnement stromal peut induire la reconnaissance immune de la tumeur et conduire à sa régression (Yu P *et al.*, 2006). Par exemple, une récente étude a mis en évidence que la sensibilisation des cellules stromales à la destruction par des CTL

conduit à l'éradication de la tumeur (Zhang B *et al.*, 2007).

b. Bilan et perspectives

Les virus oncolytiques exprimant des TAA sont nombreux à avoir été testés dans des essais expérimentaux variables (Harrop R *et al.*, 2006 ; Arlen PM *et al.*, 2007 ; Shen Y *et al.*, 2005). Comme nous l'avons vu, l'approche est la même que l'utilisation de vecteurs viraux non répliquatifs. Communément, les TAA étudiés dans cette stratégie sont le CEA, PSA, MUC-1, Melan-A/MART-1, tyrosinase et gp100, HPV-E2 et 5T4 (un antigène de tumeur fréquemment rencontré dans les tumeurs du colon, de l'estomac et des ovaires). Le virus de la vaccine exprimant ces TAA a démontré des réponses CTL anti-TAA chez les patients traités.

Les essais précliniques sont nombreux dans ce domaine, mettant en œuvre différents modèles tumoraux et différents vecteurs oncolytiques. Cependant l'inconvénient potentiel de la virothérapie oncolytique est que, la plupart du temps, le traitement doit être répété, car le virus ne peut infecter qu'une partie des cellules tumorales *in vivo*. Le développement d'anticorps neutralisants du vecteur viral peut affaiblir les effets boosters des réinjections et prévenir les tumeurs d'une autre infection virale (Ikeda K *et al.*, 1999). C'est pourquoi il est important de développer une stratégie qui permette des vaccinations répétées, comme l'utilisation de différents vecteurs viraux.

Cette nouvelle approche thérapeutique fera sans doute l'objet d'essais cliniques pour le contrôle de cancers avancés.

B. Vectorologie et thérapie monoclonale dans l'immunothérapie antitumorale

I. Thérapie monoclonale : présentation

a. Anticorps monoclonaux : historique

C'est ainsi que Michel Fougereau, grand immunologiste, vétérinaire de surcroît, a résumé la notion d'anticorps monoclonal en 2009, dans un éditorial paru dans la revue m/s :

« C'est seulement cinq ans après la première vaccination antirabique mise au point par Pasteur en 1885 que deux acquisitions majeures en immunologie furent publiées par von Behring et Kitasato. Ces auteurs montrèrent en effet que des cobayes immunisés avec des doses sublétales de toxine tétanique devenaient résistants à l'administration ultérieure d'une dose létale, mais qu'ils succombaient à l'injection de toxine diphtérique. La réciproque étant vraie, c'est la notion de spécificité qui était ainsi clairement définie. Les auteurs montrèrent en outre que les facteurs responsables de cet état d'immunité étaient présents dans le sérum des animaux vaccinés. La notion d'anticorps était née, étroitement liée à la propriété fondamentale de leur spécificité de reconnaissance. Quelques années plus tard, Metchnikoff compléta la panoplie des défenses de l'organisme en décrivant la phagocytose d'agents bactériens par les macrophages, constituant un des volets de l'immunité dite innée, non spécifique (Metchnikoff E, 1895). Il faudra plus d'un siècle pour que l'on se rende compte que les deux formes d'immunité, « adaptative » et « innée », constituent en fait un continuum intégré chez les mammifères et donc chez l'homme (Janeway CA Jr, 1989). Il ne faudra guère moins de temps pour que soient élucidées les bases moléculaires et génétiques de l'extraordinaire diversité des anticorps, molécules synthétisées par les lymphocytes B. Il existe une autre espèce de lymphocytes, identifiés seulement au début des années 1960, hélas tristement célèbres puisqu'ils sont la cible du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), les lymphocytes T. Les deux types de lymphocytes ont développé des mécanismes de diversification similaires,

bien qu'exprimés à travers des molécules distinctes : les anticorps, ou immunoglobulines (Ig) pour les B, et les récepteurs T ou TCR pour les T. Fonctionnellement, les TCR restent fixés à la membrane cellulaire T, alors que les immunoglobulines peuvent être membranaires ou circulantes, ce qui explique les observations originelles de von Behring et Kitasato. Pour compléter l'équipement qui constitue l'ossature du système immunitaire adaptatif, il convient d'ajouter les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité, ou CMH, décrits en particulier chez l'homme par Jean Dausset ; les molécules du CMH jouent un rôle essentiel dans la liaison entre l'immunité innée et l'immunité adaptative par leur intervention cruciale dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes lors d'une stimulation antigénique.

L'élucidation des bases moléculaires et génétiques de la diversité des anticorps a mobilisé la communauté des immunologistes pendant trois quarts de siècle. On notera avec intérêt, en cette année Darwin, que la première théorie sur l'origine des anticorps, formulée par Ehrlich en 1901, était typiquement darwinienne, et qu'elle s'est avérée correcte dans ses grandes lignes, moyennant l'introduction du concept de clonalité. Pour Ehrlich en effet, le lymphocyte exprimait à sa surface une collection de récepteurs distincts, la stimulation par un antigène ayant pour effet d'amplifier les seuls récepteurs spécifiques rapidement libérés dans le sang.

La notion de distribution clonale, impliquant que chaque lymphocyte n'exprime qu'une seule sorte de récepteur, donc d'immunoglobulines, a été introduite indépendamment par Burnet et par Jerne (Burnet FM, 1957 ; Jerne NK, 1955), pour rendre compte du phénomène de tolérance décrit par Medawar (Billingham RE *et al.*, 1953). De quoi s'agit-il ? Lorsque l'on greffe un fragment de peau d'une souris adulte de souche A à une souris adulte de souche B, le greffon est rejeté en une dizaine de jours. Il s'agit d'un phénomène immunologique, car si l'on renouvelle l'opération, la durée du rejet est très accélérée. Génétiquement, il s'agit d'une incompatibilité liée au CMH. Medawar a montré que si l'on injectait des cellules A à une souris nouveau-née B, celle-ci tolérait la greffe de peau de A une fois à l'état adulte. Cette observation fondamentale montre que la reconnaissance du soi est acquise. Elle impose donc une mise à l'écart des lymphocytes potentiellement agresseurs du soi. La solution la plus simple (mais pas la seule) consiste donc à éliminer les seuls lymphocytes porteurs des spécificités concernées selon un processus de sélection négative, typiquement

darwinien, et qui se poursuivra tout au long de la vie de l'individu. La seule façon d'éliminer les lymphocytes porteurs des seuls récepteurs concernés est donc de proposer que la ventilation des spécificités est strictement clonale, ce qui a depuis été largement vérifié, aussi bien pour les lymphocytes B que pour les T. Incidemment, on voit bien qu'un défaut de contrôle ouvre la porte à une auto-immunité pathologique. Perçu dans son ensemble, le système immunitaire adaptatif est constitué chez l'homme d'environ 10^{12} lymphocytes dont 1/5 de B, responsables de la synthèse de quelques... 10^{20} molécules d'immunoglobulines ! Cette extraordinaire complexité rend compte de l'énorme potentialité de reconnaissance du système immunitaire adaptatif. Elle résulte de l'organisation mosaïque d'un nombre limité de gènes Ig et TCR qui sont aléatoirement « réarrangés » au cours de la différenciation des lymphocytes B et T (Tonegawa S, 1983).

En règle générale, lors d'une stimulation antigénique, les anticorps et les TCR produits sont encore très hétérogènes. Si l'on veut cibler de façon univoque une structure antigénique précise (épitope), on doit donc idéalement disposer d'un anticorps homogène, donc monoclonal, et c'est ce qu'ont réalisé Köhler et Milstein en 1975 (Kohler G *et al.*, 1975). L'astuce a consisté à fusionner une cellule maligne de la lignée B (un plasmocytome murin) avec un lymphocyte B provenant d'un animal immunisé. Cet hybridome combine ainsi les propriétés d'immortalité de la cellule maligne et la spécificité du lymphocyte. Les anticorps monoclonaux (Acm) étaient nés. Produits chez la souris contre une quantité rapidement croissante d'antigènes, ils furent d'abord exclusivement utilisés pour un usage *in vitro*, donc de diagnostic. Leur utilisation dans un but thérapeutique chez l'homme n'est pas directement possible, l'organisme humain fabriquant ses propres anticorps contre ces intrus murins, et ce sont les techniques du génie génétique qui ont permis d'obtenir progressivement des anticorps murins de plus en plus « humanisés ». C'est ainsi qu'ont été successivement produits des anticorps chimériques, dans lesquels les parties constantes des Ig murines étaient remplacées par leurs homologues humaines (Morrison SL *et al.*, 1984), puis des anticorps humanisés, consistant à insérer les régions hypervariables murines spécifiques de la cible à la place de leurs homologues humaines (Queen C *et al.*, 1989), pour finalement faire produire directement par des souris des anticorps entièrement humains par les techniques d'inactivation et d'insertion géniques

(Lonberg N *et al.*, 1994 ; Green LL *et al.*, 1994). On dispose ainsi d'anticorps monoclonaux humains pour lesquels l'immunogénicité chez l'homme est réduite au minimum, sans toutefois être totalement annihilée, soit en raison de différences au niveau des glycosylations, soit du fait qu'un anticorps, même autologue, reste toujours physiologiquement antigénique (idiotypie).

Les premières cibles visées par les AcM ont porté sur des cellules du système immunitaire lui-même, afin de prévenir le rejet de greffe (molécules CD3 des lymphocytes T), mais très rapidement le champ d'application des AcM s'est considérablement élargi, en particulier dans le domaine de la cancérologie, où la possibilité de tuer spécifiquement les cellules cancéreuses est bien entendu un acquis considérable par rapport à une chimiothérapie lourde. C'est dans le domaine des tumeurs lymphoprolifératives que les avancées les plus spectaculaires ont été d'abord obtenues, bientôt suivies par l'utilisation d'AcM dirigés contre des récepteurs de la famille des EGF-R (*epidermal growth factor receptors*) dans certains cancers du sein. De fait, le nombre de demandes d'AMM explose littéralement dans cette indication ; des résultats plus que prometteurs ont d'ores et déjà été obtenus depuis plusieurs années dans d'autres maladies redoutables et fortement invalidantes telles que la polyarthrite rhumatoïde, et plus récemment, la sclérose en plaques ou la dégénérescence maculaire liée à l'âge.

Si la structure moléculaire de la cible identifiée par un AcM est par définition bien identifiée, en revanche les modes d'action ne sont pas toujours évidents, et les effets secondaires indésirables, voire redoutables - on pense par exemple à l'emballement d'un réseau de cytokines pouvant conduire à un état de choc - doivent être sérieusement anticipés. Il n'en reste pas moins que les AcM représentent une avancée majeure dans le ciblage thérapeutique. À ce titre, ils peuvent servir d'« adressage » de cellules tueuses, de toxines ou d'éléments radioactifs et les développements technologiques dans ces divers domaines sont à l'évidence en pleine expansion. »

Aujourd'hui, plus d'une vingtaine d'anticorps sont disponibles dans des indications de plus en plus larges. Un grand nombre de nouveaux anticorps est actuellement en développement.

b. Anticorps monoclonaux et tumeurs solides

En l'espace de dix ans, les anticorps monoclonaux (Acm) ont intégré les stratégies thérapeutiques utilisées dans la plupart des cancers. Cette véritable révolution repose sur des progrès conceptuels et biotechnologiques. Progrès conceptuels d'abord, avec la compréhension que la cellule tumorale ne doit plus être considérée comme une cible isolée, mais bien comme un ennemi se nourrissant du microenvironnement dans lequel il évolue. Il est donc rapidement apparu attractif de tenter d'interrompre les interactions favorables à la croissance des tumeurs en ciblant les récepteurs présents à la surface des cellules tumorales, ou leur(s) ligand(s). Progrès biotechnologiques ensuite, avec la possibilité de synthétiser des anticorps chimériques ou humanisés, voire totalement humains, permettant, au contraire des anticorps murins, leur administration répétée sans craindre de déclencher une réponse immunitaire trop importante. Une dizaine d'années s'est écoulée depuis l'enregistrement du premier Acm en oncologie (trastuzumab, 1997). Aujourd'hui des progrès scientifiques et cliniques considérables ont été réalisés et une dizaine d'anticorps est utilisée en oncologie. Nous nous focaliserons sur une cible pertinente et validée : HER-2 pour laquelle les anticorps font partie de l'arsenal thérapeutique actuel et qui est une cible de l'association de la vectorologie et de la thérapie monoclonale, que nous développerons ultérieurement.

c. La cible HER-2 et l'Acm trastuzumab

HER-2 fait partie de la famille des récepteurs de facteurs de croissance épidermique (EGFR), famille composée de 4 membres, HER-1 (également appelé EGFR), HER-2, HER-3 et HER-4. Ces protéines transmembranaires partagent la même structure moléculaire et se composent d'un domaine extracellulaire permettant la liaison avec des ligands spécifiques, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire ayant une activité tyrosine kinase. La liaison avec un ligand induit généralement l'homodimérisation ou l'hétérodimérisation du récepteur, puis, en

cascade, l'activation de voies de signalisation favorisant la prolifération cellulaire, la mobilité cellulaire ou l'invasion tissulaire, stimulant la néoangiogenèse ou encore inhibant l'apoptose. Au contraire des autres membres des EGFR, HER-2 n'a pas de ligand connu. Il peut cependant adopter une conformation (par clivage d'un domaine extracellulaire) mimant l'activation par un ligand et induire ainsi la dimérisation sans l'intervention d'un ligand (Hudis CA, 2007). Dès lors, on comprend aisément l'intérêt de bloquer ces dimérisations (dépendantes ou non du ligand) permettant ainsi d'interférer avec une activation favorisant la croissance de la tumeur.

HER-2 a très vite été une cible attractive en raison de l'amplification du gène correspondant qui est observée dans 20 % à 30 % des carcinomes du sein invasifs, avec comme conséquence une augmentation sélective de l'expression de la protéine transmembranaire. Cette hyperexpression est associée à un comportement agressif des tumeurs et un pronostic sombre de la maladie (Slamon DJ *et al.*, 1989).

Le trastuzumab (Herceptin[®]) est un Acm humanisé qui se lie, avec une haute affinité, au domaine extracellulaire d'HER-2. Les conséquences biologiques de cette liaison sont multiples : inhibition de la dimérisation, inhibition du clivage activateur du domaine extracellulaire, induction de la destruction de HER-2 par endocytose, et recrutement de cellules du système immunitaire effectrices (Hudis CA, 2007). Même si la part respective de ces différents mécanismes d'action dans l'effet thérapeutique du trastuzumab est mal connue, l'impact de cet anticorps dans la prise en charge des patientes souffrant d'un cancer de sein surexprimant HER-2 est remarquable.

Son efficacité a tout d'abord été observée dans les cancers métastatiques avec, en monothérapie, un taux de réponse entre 12 % et 15 % chez des patientes lourdement prétraitées (Cobleigh MA *et al.*, 1999), et même de 30 % en première ligne (Vogel CL *et al.*, 2002). Les taux de réponse furent très supérieurs lorsque l'Acm fut associé avec le paclitaxel ou une anthracycline (Slamon DJ *et al.*, 2001), puis dans de multiples combinaisons avec d'autres agents de chimiothérapie (Hudis CA, 2007).

Fort de ces résultats, le potentiel du trastuzumab a ensuite été évalué dans le traitement adjuvant des cancers du sein localisés, opérables, surexprimant HER-2. Trois études de phase III dont les résultats ont été combinés, impliquant plus de 3000 patientes, ont démontré que le trastuzumab associé à différents régimes de

chimiothérapie comportant anthracyclines ou taxanes, réduit le risque de récurrence de 49 % et de mortalité de 39 %. Il augmente de façon significative la survie sans progression (bénéfice absolu de 18 % à 4 ans) et la survie globale (bénéfice absolu de 4,8 % à 4 ans) (Romond EH *et al.*, 2005). Des résultats similaires ont été observés dans une étude européenne effectuée chez plus de 5 000 patientes (Piccart-Gebhart M *et al.*, 2005). Le bénéfice absolu est très significatif et comparable à ce qui est obtenu avec la chimiothérapie ou l'hormonothérapie adjuvantes. Plus récemment, les études cliniques portant sur les traitements néoadjuvants (avant la chirurgie), ont démontré que l'addition du trastuzumab au traitement standard permettait d'améliorer le taux de réponse histologique complète et la survie sans progression (Buzdar AU *et al.*, 2007).

Cependant, l'efficacité du trastuzumab est loin d'être parfaite et semble être limitée dans le temps, plusieurs mécanismes pouvant contribuer à une résistance innée ou acquise. L'étude de ces mécanismes est essentielle afin de progresser vers de nouvelles stratégies thérapeutiques. Par exemple, HER-2 pourrait interagir avec le récepteur IGF-1R et emprunter ainsi les voies de signalisation/activation de ce récepteur lorsque le trastuzumab bloque les voies activées directement par HER-2. De même, les voies de signalisation peuvent être activées en aval et indépendamment des récepteurs, par exemple *via* une activation constitutionnelle d'Akt ou une perte de fonction du gène suppresseur de tumeur PTEN (*phosphatase and tensin homologue*), favorisant ainsi une résistance des cellules à l'apoptose (Valabrega G *et al.*, 2007). Dès lors, on comprend aisément l'intérêt de développer des anticorps anti-IGF-1R ou des molécules inhibant la voie de signalisation passant par Akt.

Jusqu'à présent, l'intérêt du trastuzumab semblait limité aux patientes avec un cancer du sein dont les cellules exprimaient HER-2. Récemment, il a été montré qu'une fraction non négligeable de cancers de l'estomac exprime une grande quantité d'HER-2. Une étude randomisée de phase III (dont les résultats ne sont pas encore publiés) incluant près de 600 patients souffrant d'un cancer gastrique surexprimant HER-2 semble montrer que l'adjonction de trastuzumab à une chimiothérapie de type 5-fluorouracile/cisplatine peut améliorer le taux de réponse et la survie globale, ouvrant des perspectives très intéressantes pour ce type de cancer au pronostic défavorable (Van Cutsem E *et al.*, 2009).

Des essais précliniques expérimentant la possibilité de faire produire des Acm par les vecteurs viraux ont été menés.

II. Vecteurs viraux et thérapie monoclonale dans la lutte antitumorale

a. Stratégie

Les anticorps monoclonaux thérapeutiques commercialisés ou en développement sont produits à partir de cellules de mammifères en culture, dont notamment la cellule de hamster CHO. Ces systèmes cellulaires permettent la production industrielle de protéines complexes possédant des structures, activités biologiques et propriétés pharmacodynamiques proches des protéines naturelles. Mais des coûts de production élevés et un prix du traitement prohibitif pourraient dans l'avenir limiter l'accessibilité de ces thérapies innovantes au plus grand nombre et freiner ce marché pourtant en très fort développement. Parallèlement à l'optimisation de la productivité des systèmes mammaliens, l'industrie pharmaceutique et biotechnologique développe activement des systèmes de production alternatifs espérés moins coûteux, plus efficaces et permettant une amélioration de l'efficacité thérapeutique des anticorps thérapeutiques. Ces systèmes alternatifs de production des Acm sont des systèmes bactériens, des levures et champignons filamenteux, des cellules d'insectes, des plantes transgéniques, des animaux transgéniques et des cellules aviaires.

De plus, le poids moléculaire élevé des anticorps ne leur permet pas une bonne infiltration dans les tumeurs importantes (Jain RK *et al.*, 1988). C'est pourquoi l'utilisation de petits fragments comme un fragment variable simple chaîne (scFv ; single-chain fragment-variable) peut surmonter ces problèmes. Cependant, ces molécules améliorées présentent des limites puisqu'elles sont éliminées rapidement et ont une disponibilité locale insuffisante (Hudson PJ *et al.*, 2003).

Des groupes d'études ont alors cherché à faire exprimer des anticorps

monoclonaux ou leurs fragments dans les cancers ou cellules immunitaires *in vivo*, en faisant intervenir des vecteurs viraux.

b. Exemple : utilisation d'un adénovirus pour produire des Acm anti-HER-2

(Jiang M *et al.*, 2006)

i. Objectif

L'effet thérapeutique des Acm est dépendant de la dose, seulement il est impossible d'augmenter la concentration sérique an Acm sans limite. L'utilisation de grande quantité d'Acm est limité par le coût des Acm, la toxicité des impuretés présentes même après purification et la clairance rénale. C'est pourquoi la thérapie génique pour créer *in vivo* des Acm est supposée être la meilleure candidate pour apporter de hautes concentrations d'anticorps complètement purs.

Cette étude a pour but de montrer la faisabilité de cette approche en testant un transfert de gène codant pour un anticorps entier anti-HER-2 chez la souris nude.

ii. Résultats

● Construction d'un adénovirus recombinant Ad5-Tab

Le trastuzumab, un anticorps humanisé bien caractérisé anti-HER-2, administré en i.v. pour ses propriétés antitumorales, a été choisi comme modèle d'anticorps pour évaluer l'expression *in vivo* des anticorps entiers produits grâce au transfert de gène à partir de Ad5-Tab et son efficacité antitumorale. Deux adénovirus recombinants sont construits, l'un porteur des gènes codant pour l'anticorps anti-HER-2 (Ad5-Tab), l'autre portant LacZ (Ad5-LacZ).

- **Expression et assemblage des chaînes lourde et légère de l'anticorps anti-HER-2 *in vitro***

Des cellules L-02 sont infectées par Ad5-Tab ou Ad5-LacZ avec une MOI de 10 (*multiplicity of infection*) pour chacun. L'expression des anticorps est estimée par ELISA indirect. Les anticorps issus des cellules infectées par Ad5-Tab sont capables de se lier à des protéines HER-2. Comme la figure 27.A le montre, l'expression de l'Ac anti-HER-2 *in vitro* est temps-dépendante, alors qu'aucune expression d'Ac n'est décelable dans les cellules infectées par Ad5-LacZ.

On peut voir par western blot que l'Ac obtenu grâce à Ad5-Tab est identique à celui utilisé dans le trastuzumab (Fig 27. B et C).

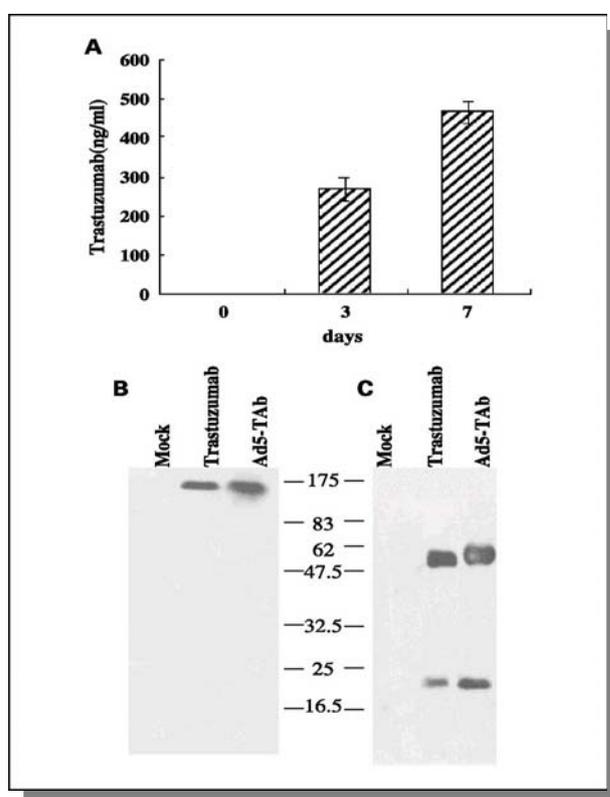


Figure 27 : Expression *in vitro* d'anticorps dans les cellules L-02 infectées par Ad5-Tab (Jiang M *et al.*, 2006)

A : analyse ELISA du surnageant des cellules L-02 infectées par Ad5-Tab.

B : western blot du trastuzumab commercial et du surnageant des cellules L-02 infectées par Ad5-LacZ et Ad5-Tab en conditions non réductrices.

C : western blot du trastuzumab commercial et du surnageant des cellules L-02 infectées par Ad5-LacZ et Ad5-Tab en conditions réductrices.

Aucune bande additionnelle n'est détectable, ce qui est attendu lorsque le ratio

de chaînes lourdes et légères est le bon, ce qui signifie que les Ac produits par les hépatocytes *in vitro* ont été correctement dimérisés et qu'aucune chaîne lourde ou légère n'est en excès (Fig 27.B). En conditions réductrices, deux bandes de 50 et 25 kDa sont respectivement détectées et correspondent aux mêmes que celles obtenues avec le trastuzumab (Fig 27.C).

- **Spécificité de liaison de l'anticorps issu de Ad5-Tab**

L'immunofluorescence indirecte est utilisée afin d'évaluer cette activité de liaison spécifique. L'Ac anti-HER-2 exprimé à partir de Ad5-Tab est capable de reconnaître HER-2 exprimé à la surface cellulaire. Sur la figure 28 : un fort signal fluorescent FITC (fluorescein isothiocyanate) est émis à la surface des cellules SKOV-3 HER-2+, ce qui indique que les Ac se lient à HER-2 sur la surface cellulaire (Fig 28.C). A contrario, aucun signal fluorescent n'est détectable à la surface des cellules BT549/HER-2-, ce qui montre qu'aucun Ac ne se fixe à la surface cellulaire n'exprimant pas HER-2 (Fig 28.A B).

Le trastuzumab commercial présente la même densité de fluorescence à la surface des cellules exprimant HER-2 que les Ac produits par Ad5-Tab (Fig 28.D). Ainsi l'activité de cet Ac produit par le biais d'un vecteur viral est la même que sa forme commercialisée.

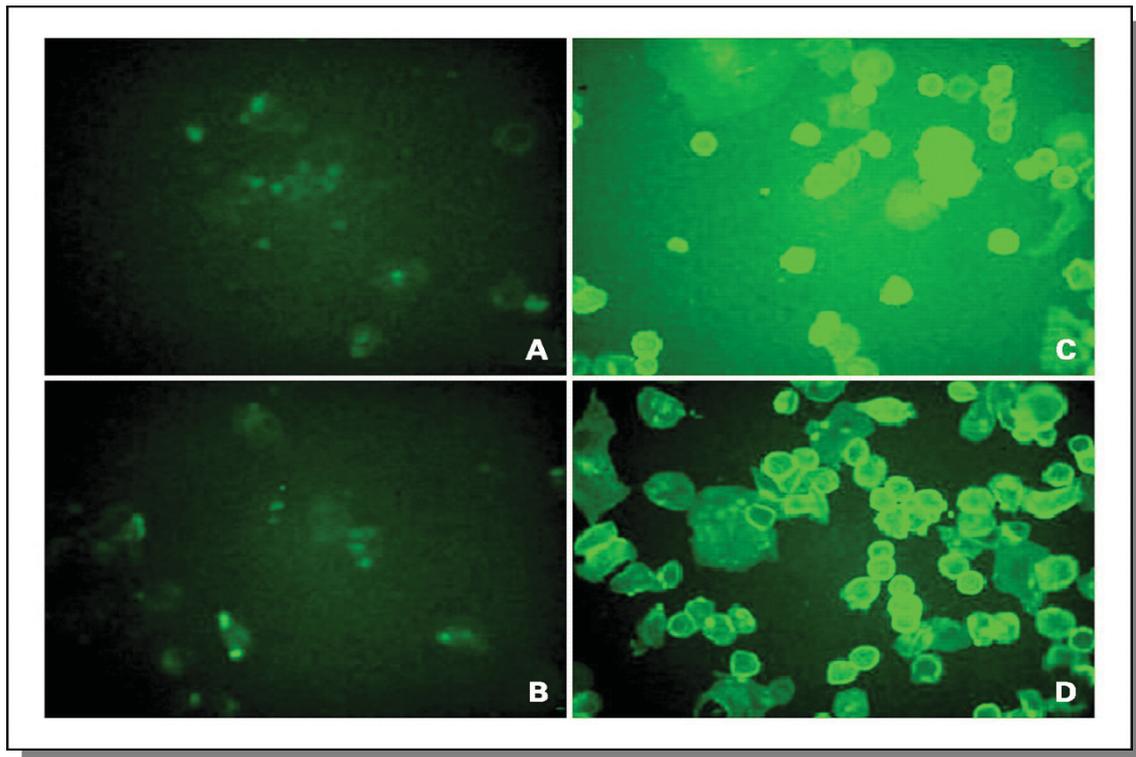


Figure 28 : Liaison spécifique de l'anticorps anti-Her-2 exprimé par Ad5-Tab

A B : BT549 incubés avec le surnageant et le trastuzumab respectivement.

C D : SKOV-3 incubés avec le surnageant et le trastuzumab respectivement.

(Jiang M *et al.*, 2006)

- **L'expression *in vivo* des anticorps produits par Ad5-Tab est temps-dépendante**

Après avoir caractérisé la spécificité et l'affinité de cet anticorps produit par le biais d'un vecteur viral, des souris nues, préalablement inoculées avec des cellules SKOV3, se sont vues injecter une fois, dans la veine de la queue, $2 \cdot 10^9$ pfu d'adénovirus recombinants, afin d'évaluer l'expression dans le temps de ces Ac. Dix souris ont subi le même protocole et ont été saignées à des moments différents pour quantifier la présence d'Ac dans le sérum. Ainsi, les anticorps sont décelables *in vivo* au bout de 3 jours au plus tôt après l'administration. S'en suit une augmentation de l'expression avec un pic de concentration sérique au jour 7 puis une diminution progressive. Globalement la concentration des quatre premières semaines est supérieure à $40 \mu\text{g/ml}$ (Fig 29).

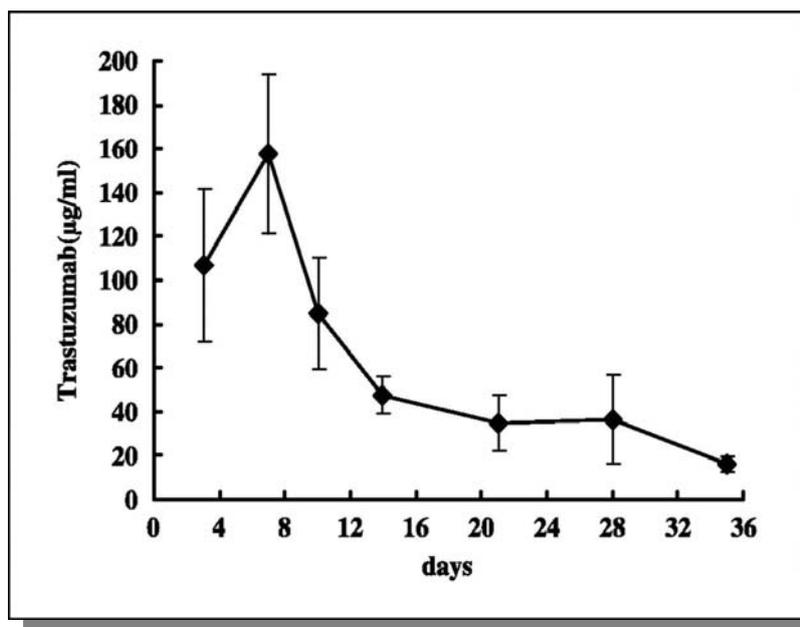


Figure 29 : Concentration sérique en anticorps anti-HER-2 de souris nudes inoculées par SKOV-3 en fonction du temps

(Jiang M *et al.*, 2006)

- **Inhibition *in vivo* de la croissance tumorale**

Étant données les hautes concentrations sériques en anticorps, évaluées préalablement, deux approches thérapeutiques différentes ont été menées.

Dans le premier groupe, figuré en Fig 30 A, traité avec Ad5-Tab, une activité antitumorale est observée avec très peu de croissance visible du nodule tumoral au bout de 35 jours : 6 souris présentent une régression complète, 2 souris montrent une croissance des nodules en dessous de 10mm^3 , les deux dernières présentent des volumes tumoraux jusqu'à environ 100mm^3 . Les souris traitées avec Ad5-LacZ (groupe témoin), portent des tumeurs beaucoup plus volumineuses ($683,2 \pm 220,9\text{mm}^3$), la différence étant significative. Ces données suggèrent qu'une seule injection de Ad5-Tab permet d'obtenir une concentration importante et durable d'anticorps anti-HER-2 capable de contrôler la croissance tumorale (Fig 30.A).

Le deuxième groupe a permis d'évaluer l'effet thérapeutique sur des animaux porteurs de grosses tumeurs ($>200\text{mm}^3$). La figure B montre que la croissance tumorale est considérablement inhibée chez les souris traitées par Ad5-Tab avec un

volume moyen de $417,8 \pm 83,8 \text{ mm}^3$ contre $1005,9 \pm 189,8 \text{ mm}^3$ chez les souris traitées avec Ad5-LacZ (Fig 30.B).

Cette étude suggère qu'une concentration importante et stable en Ac n'est pas suffisante en thérapie anticancéreuse, mais que plus le traitement est effectué tôt et plus on obtient un effet satisfaisant. Ainsi, les anticorps exprimés par un adénovirus recombinant représentent une méthode efficace et peu onéreuse pour contrôler la croissance tumorale. C'est la première fois qu'un anticorps entier bioactif est produit grâce à un adénovirus en dehors des cellules B (Jiang M *et al.*, 2006).

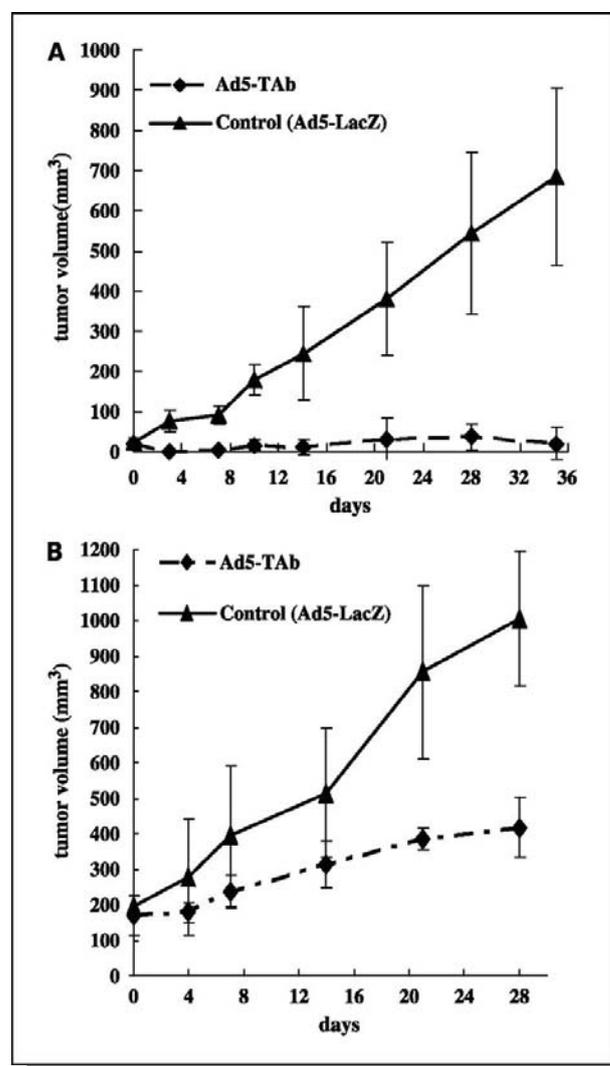


Figure 30 : Activité antitumorale des anticorps anti-HER-2 générés par Ad5-Tab dans les tumeurs portées par des souris nudes

(Jiang M *et al.*, 2006)

Les essais précliniques dans ce domaine ne sont pas nombreux. Pourtant la thérapie génique pour la production d'anticorps représente un système intéressant pour les raisons suivantes : un faible coût de production par rapport aux Acm utilisés couramment et une production *in vivo* sans impuretés.

Les vecteurs viraux ont été utilisés également pour la production de scFv.

c. Vecteurs viraux et anticorps dirigés contre le récepteur 4-1BB (CD137)

Ye *et al.* ont démontré que la transfection de cellules murine de mélanome par un vecteur rétroviral portant le gène codant le scFv du récepteur 4-1BB, membre de la famille des récepteur du TNF qui permet l'activation des lymphocytes T lorsqu'il est activé, améliore la réponse immunitaire antitumorale, par rapport au ligand naturel lui même, 4-1BBL (Ye Z *et al.*, 2002).

d. Vecteurs viraux et anticorps dirigés contre DR5

Une autre étude rapporte une suppression significative, dans un modèle murin, de la croissance tumorale des cancers des poumons ou du foie, après avoir fait exprimer un scFv spécifique du récepteur de mort 5 (DR5 : *Death Receptor 5*), par un AAV (Shi J *et al.*, 2006).

e. Vecteurs viraux et anticorps dirigés contre un marqueur tumoral

Des lymphocytes T ont été transduits par un vecteur rétroviral codant pour un scFc spécifique de marqueur de cellule de cancer rénal. Ces lymphocytes T ont été utilisés dans des essais cliniques pour traiter des patients avec des métastases rénales et ont présentés des résultats prometteurs (Lamers CH *et al.*, 2004).

Les études concernant l'utilisation de vecteurs viraux dans les thérapies monoclonales sont plutôt récentes et majoritairement au stade d'études précliniques.

Conclusion de la troisième partie : Ainsi, dans le cadre de l'immunothérapie antitumorale, les vecteurs viraux offrent de nombreuses possibilités d'association avec des stratégies préexistantes, qu'il s'agisse de virothérapie oncolytique, où comme nous avons pu le voir l'efficacité antitumorale est augmentée ou qu'il s'agisse de thérapie monoclonale, où là, les coûts de production seraient diminués et l'obtention d'anticorps sans impureté serait possible. Cependant, les recherches dans le domaine de la virothérapie oncolytique sont bien plus avancées et font l'objet de nombreux essais cliniques, et même s'ils donnent des résultats encourageants dans de nombreuses stratégies, il ne faut pas perdre de vue qu'il s'agit de virus, initialement potentiellement infectieux et que leur utilisation n'est pas dénuée de risques.

Quatrième partie :

Limites et perspectives de l'utilisation des vecteurs viraux dans l'immunothérapie antitumorale

La thérapie génique utilisant des vecteurs viraux ou non (Verma IM *et al.*, 2005), a largement progressé, des premières découvertes et essais cliniques en 1989 (Blaese RM *et al.*, 2005) au premier produit commercial mis sur le marché pour traiter des bébés souffrant d'un déficit immunitaire gravissime lié au chromosome X en 2000. Les deux tiers des essais cliniques de thérapie génique font intervenir des vecteurs viraux, étant donné leur efficacité accrue par rapport aux vecteurs non viraux (Edelstein ML *et al.*, 2007) et environ 67% des essais cliniques de thérapie génique concernent les maladies cancéreuses.

Alors que les vecteurs viraux ont présenté un franc succès dans le traitement de quelques maladies, comme la déficience en enzyme adénosine désaminase (Blaese RM *et al.*, 1995) et la maladie de Parkinsons (Kaplitt MG *et al.*, 2007) ou dans le domaine antitumoral, ils possèdent également un certain nombre d'inconvénients qui nécessitent le développement de nouvelles stratégies, pour une sécurité et une efficacité augmentées.

La mort d'un patient, déficitaire en ornithine transcarbamylase, dans un essai clinique de thérapie génique en 1999 (Raper DE *et al.*, 2003 ; Couzin J *et al.*, 2005) et l'induction de leucémies chez des patients atteints de SCID-X en 2003 (Hacein-Bey-Abina S *et al.*, 2003) ont obligé les autorités à renforcer les règles pour mener des essais cliniques et augmenter la sécurité des traitements. Récemment, au cours de l'été 2007, la mort d'un patient dans le cadre d'un essai clinique sur la polyarthrite rhumatoïde, a poussé la recherche à remettre en cause l'innocuité des vecteurs AAV dans les essais cliniques (Hughes V, 2007). Il est apparu évident que notre connaissance des interactions complexes entre les mécanismes cellulaires, le système immunitaire et les vecteurs viraux limite le développement de nouveaux traitements de thérapie génique. Afin de développer des traitements plus efficaces et plus sécuritaires utilisables en clinique, il est nécessaire de comprendre de façon approfondie le comportement des vecteurs viraux chez les patients.

A. Vecteurs viraux dans l'immunothérapie antitumorale : limites et améliorations probables

Un vecteur viral optimal utilisé en immunothérapie antitumorale doit posséder certaines propriétés : il doit être capable d'induire une réponse T cytotoxique durable, et/ou une réponse à médiation humorale, de délivrer de larges cassettes ADN, de ne pas dépendre d'une immunité préexistante chez l'hôte, d'être facile à construire, doit être peu onéreux, doit être incapable de se répliquer *in vivo*, sauf dans le cadre de la virothérapie, doit avoir de simples conditions de stockage et doit avoir prouvé son innocuité clinique et être facile à administrer.

Malheureusement, presque tous les vecteurs présentent une propriété néfaste pour une stratégie thérapeutique donnée.

Vecteur viral	Niveau d'expression du transgène	Durée d'expression	Capacité transduction	Immunogénicité	Références
Retrovirus	moyen	long (intégration)	Pas dans les cellules qui ne se divisent pas	faible	Anson DS, 2004
Lentivirus	élevé	long (intégration)	oui	faible	Quinonez R <i>et al.</i> , 2002
Adénovirus	élevé	éphémère	oui	élevée	Zhang W, 1999
AAV	moyen	long	oui	faible	Goncalves MA, 2005
HSV	élevé	éphémère	oui	élevée	Epstein <i>et al.</i> , 2005
SVF	élevé	éphémère	oui	élevée	Lundstrom K, 2003

Tableau 3 : Caractéristiques des vecteurs viraux utilisés dans l'immunothérapie antitumorale (Collins SA *et al.*, 2008)

Les plus importantes limites sont l'immunogénicité du vecteur, et l'insertion potentielle de mutations lors d'une intégration du génome viral.

I. Vecteurs viraux et immunogénicité potentielle

a. Vecteurs viraux et immunogénicité : exemple tragique

Le 17 septembre 1999, toute la communauté scientifique rentre en émoi lorsque Jesse Gelsinger, un jeune homme de 18 ans atteint d'un déficit en ornithine-transcarbamylase (OTC, enzyme hépatique impliquée dans le métabolisme de l'ammoniac) décède à la suite d'un état de choc provoqué par l'injection de $3,8 \cdot 10^{13}$ particules d'adénovirus portant le gène OTC par voie intra-artérielle hépatique. On peut être surpris du fait que Jesse ait subi cette thérapie génique, sa maladie étant peu sévère. Même si on a pu attribuer la réaction fulminante de ce patient à une sensibilité personnelle, la suspicion s'est installée : l'adénovirus peut tuer même quand il s'agit d'un vecteur théoriquement moins immunogène, un vecteur de 2ème génération, amputé des gènes E1 et E4. Le comble étant que le virus s'est retrouvé disséminé dans tous les organes du jeune homme, mais que le transfert du gène de l'OTC au foie fut extrêmement faible. Aucun des autres patients de l'essai clinique n'avait d'ailleurs exprimé le transgène de façon significative. La prise de conscience associée à ce dramatique événement a sans doute amené les vectorologistes à s'intéresser de plus près à l'évaluation des paramètres de l'immunité contre les virus utilisés comme vecteur chez les futurs candidats à la thérapie génique.

Non seulement l'immunogénicité des vecteurs peut mener à de graves effets secondaires mais elle peut aussi nuire à l'efficacité du traitement désirée.

b. Vecteurs viraux et immunogénicité : diminution de l'efficacité

i. Vecteur viral et induction d'une réponse immunitaire

L'immunogénicité du vecteur est le facteur le plus important intervenant dans la sécurité du patient qui reçoit un traitement mettant en œuvre des vecteurs viraux. Cette immunogénicité provient usuellement, de protéines virales ou de leur capacité à infecter des cellules dendritiques ou encore les macrophages. Premièrement, la

réponse innée de l'hôte produit des cytokines, induit une réponse cellulaire inflammatoire non spécifique et conduit à la neutralisation du virus par le complément. Seulement cette réponse immunitaire peut conduire à l'élimination du vecteur et des cellules transduites, diminuant ainsi la durée du traitement attendue (Bessis N *et al.*, 2004). Secondairement la réponse immunitaire adaptative est rapidement déclenchée pour neutraliser le vecteur (Harding JA *et al.*, 1997), empêchant toute réutilisation du vecteur ultérieurement.

Le facteur limitant de l'utilisation des adénovirus, vecteurs les plus prisés (Ghosh SS *et al.*, 2006), réside dans la réponse immunitaire innée du patient et la présence d'anticorps préexistants, détectables chez 97% des individus (Chirmule N *et al.*, 1999) à cause d'exposition préalable au virus sauvage.

Comparativement aux adénovirus, l'AAV représente un autre vecteur intéressant et est connu pour déclencher une légère ou pas de réponse immune innée (Zaiss AK *et al.*, 2005), comme les retrovirus ou les lentivirus. Avec l'AAV, la quantité d'anticorps neutralisants préexistants varie avec le sérotype : de 80% pour le sérotype 2 à environ 0% pour le sérotype 5 (Raper SE *et al.*, 2003 ; Halbert CL *et al.*, 2006 ; Tenenbaum L *et al.*, 2003), d'où une possible diminution de l'efficacité thérapeutique lors de leur utilisation. Dans des essais cliniques contre l'hémophilie, l'administration d'AAV a augmenté la quantité d'anticorps neutralisants (Manno CS *et al.*, 2003) et il en a résulté la destruction des hépatocytes transduits, limitant ainsi l'expression du transgène à huit semaines (Manno CS *et al.*, 2006). Aujourd'hui, les récents effets indésirables (Kaiser J, 2007) et les conclusions sur les carcinomes hépatiques (Donsante A *et al.*, 2007) obligent à une réévaluation de l'innocuité des AAV dans le contexte de la thérapie génique.

Dans le cadre des traitements anticancéreux, l'activation immune peut intensifier les défenses naturelles contre la tumeur (Sandmair AM *et al.*, 2000 ; Immonen A *et al.*, 2004), ce qui est positif ; cependant ces réactions ne sont pas recherchées dans les autres tissus comme le foie, les poumons ou le myocarde, requérant ainsi des méthodes spécifiques d'administration ou de ciblage pour limiter

la biodistribution virale uniquement aux tissus ciblés.

ii. Vecteurs viraux et excrétion virale

L'excrétion dans l'environnement de vecteurs viraux par les patients traités doit être considérée. Une récente étude sur 1619 patients a montré qu'il existe des différences au niveau de l'excrétion virale probable dans le milieu. Apparemment les adénovirus n'ont montré presque aucune excrétion extérieure après une injection dans une tumeur cérébrale, alors que dans six publications sur huit faisant intervenir des rétrovirus, sont reportés des signes positifs d'excrétion (Schenk-Braat EA *et al.*, 2007). Même si ces risques d'excrétion peuvent être prévenus dans le cadre d'essais cliniques, une utilisation ultérieure en pratique courante ne pourra avoir lieu sans réévaluation de ces risques d'excrétion.

iii. Vecteurs viraux, immunogénicité et immunothérapie antitumorale

Des stratégies ont été développées pour contrer l'immunogénicité du vecteur dans le cadre de la thérapie génique. Pourtant d'autres recherches, notamment dans la lutte anticancéreuse, cherchent à exploiter la capacité du vecteur à stimuler une réponse immunitaire pour améliorer son potentiel thérapeutique. En effet, dans le cadre de de stratégie de primovaccination contre un TAA, par exemple, l'induction d'une réponse immunitaire contre le transgène est spécifiquement recherchée.

Le problème posé par les ré-administrations peut être contré par l'utilisation d'un autre vecteur ou en « capant » le même vecteur.

L'utilisation de vecteurs viraux pour transduire des cellules *ex vivo*, telles que CD, cellules cancéreuses, lymphocyte permet de ne pas se soucier de ces problèmes d'immunogénicité du vecteur.

II. Vecteurs viraux : réduction des effets secondaires

a. Vecteurs viraux et doses efficaces

Comme toute substance pharmaceutique, la dose et la puissance du vecteur administré sont importants en thérapie génique. Pour les vecteurs viraux, ces propriétés dépendent des processus de production et de purification, qui doivent optimiser la quantité de particules virales infectieuses par rapports aux particules défectueuses (Rodrigues T *et al.*, 2007 ; Grieger JC *et al.*, 2005 ; Baekelandt V *et al.*, 2003).

L'augmentation de la concentration locale en virus par une administration spécifique ou une méthode de ciblage peut permettre de diminuer la dose totale administrée au patient, limitant ainsi les possibles effets secondaires systémiques.

b. Vecteurs viraux et voie d'administration

i. Transduction ex vivo

Pour échapper aux réactions immunes et augmenter le contrôle sur la transduction, les méthodes *ex vivo* ont été utilisées, comme nous l'avons vu en deuxième partie, à la place des administrations *in vivo* (Heyde M *et al.*, 2007). Les conditions *in vitro* offrent un meilleur contrôle de la transduction et une plus grande sécurité mais ces méthodes sont limitées à certaine applications et sont souvent laborieuses.

ii. Transduction in vivo : administration intratumorale ou systémique

- **Vecteurs viraux et administration systémique**

Traditionnellement l'administration de drogues au patient est suivie d'une

distribution systémique par la circulation sanguine. Afin d'atteindre les concentrations thérapeutiques de vecteur dans le tissu cible, de hautes doses systémiques sont nécessaires engendrant un risque accru d'effets secondaires chez le patient. On peut cependant essayer d'augmenter la sécurité des patients en ciblant les tissus, par exemple, par l'utilisation de promoteurs spécifiques des tissus cibles, l'utilisation de promoteurs régulables (Sadeghi H *et al.*, 2005), ou l'utilisation de thérapie gène suicide faisant intervenir un couple enzyme/prodrogue comme HSV-tk et ganciclovir (Van Dillen I *et al.*, 2002).

- **Vecteurs viraux et administration intratumorale**

Les injections intratumorales représentent une méthode de routine pour délivrer des gènes par des vecteurs viraux, afin d'augmenter le transport des vecteurs dans le tissu tumoral et réduire la toxicité systémique. Cependant la concentration du produit du transgène est anormalement haute dans les organes normaux, comme le foie. Il semblerait que cette concentration anormale dans les tissus normaux soit causé par une dissémination des vecteurs viraux à partir de la tumeur. C'est ce qu'ont prouvé Wang Y *et al.* en 2003 : il existe une réelle dissémination systémique des vecteurs viraux après une injection i.t., ce qui n'exclut donc pas le risque d'effets secondaires systémiques et peut nuire à l'efficacité du traitement également (Wang Y *et al.*, 2003).

c. Vecteurs viraux et ciblage par modification de surface

La capacité des virus à transduire différents types cellulaires, à provoquer une réponse immunitaire ou à résister à l'activation du complément, dépend des propriétés des protéines de surface du virus. Afin d'influencer les interactions entre les virus et la surface cellulaire, les protéines de surface virales peuvent être modifiées, enlevées ou remplacées. Typiquement, les rétrovirus et lentivirus sont pseudotypés pour élargir leur tropisme, accroître leur rendement de production et améliorer leur innocuité, le plus souvent avec la protéine G du virus de la stomatite vésiculeuse VSV-G (Cronin J

et al., 2005).

Changer les glycoprotéines de surface d'un virus enveloppé est faisable ; il n'en est pas de même pour les virus non-enveloppés qui requièrent des approches différentes. L'attachement de la capsid virale (adénovirus de type 5) est dépendant de récepteurs CAR (*coxsackie-adenovirus receptor*) exprimés sur les tissus cibles. La quantité de CAR est souvent faible dans les tissus tumoraux, ce qui limite la transduction par les adénovirus dans de nombreux types de cancers (Mizuguchi H *et al.*, 2004). C'est pourquoi diverses approches ont été utilisées pour augmenter cette transduction (Rein DT *et al.*, 2006).

La modification peut se faire chimiquement ; parmi les méthodes les plus usitées :

- insertion de ligands spécifiques au niveau de la boucle HI de la fibre adénovirale (Work LM *et al.*, 2004) ;
- attachement de molécules sur la capsid (Parott MB *et al.*, 2003) ;
- altération chimique des protéines de capsid (Turunen MP *et al.*, 2002).

La combinaison de ces techniques a aussi été utilisée par l'équipe de Kreppel en 2005 (Kreppel F *et al.*, 2005).

La modification peut se faire génétiquement : le facteur limitant le plus important pour recouvrir des adénovirus viables par méthode génétique est le repliement correct de la fibre modifiée. Dans le cas contraire, il en résulte une diminution spectaculaire du titre viral et par conséquent, une réduction de la transduction (Magnusson MK *et al.*, 2002).

Les adénovirus couplés chimiquement à du polyéthylène glycol (PEG) se lient moins aux anticorps neutralisants (Chillon M *et al.*, 1998 ; O'Riordan CR *et al.*, 1999) et leur temps de demi-vie est alors augmenté après une administration systémique (Ogawara K *et al.*, 2004). Les adénovirus ont aussi été modifiés pour empêcher leur liaison aux récepteurs CAR initiaux, ce qui diminue la toxicité et favorise le ciblage du virus vers différents types cellulaires (Koizumi N *et al.*, 2006).

A mi-chemin entre la modification génétique et la modification chimique de la surface virale, il existe des systèmes permettant de couvrir le virus avec une large sélection de ligands. Les baculovirus et adénovirus ont été construits avec un domaine de liaison d'immunoglobuline G de synthèse et ont montré une activité fonctionnelle (Mottershead DG *et al.*, 2000 ; Volpers C *et al.*, 2003). Ces vecteurs autorisent l'exposition d'anticorps à leur surface, permettant l'utilisation de nombreux anticorps spécifiques de tissus. Une autre méthode consiste à utiliser des réactifs cross-linkers, comme les anticorps bi-spécifiques, pour permettre un rapprochement moléculaire entre le vecteur et le ligand ciblé (Choi VW *et al.*, 2005). Les vecteurs biotinylés permettent d'élargir la sélection de différentes molécules en utilisant l'avidine comme réactif cross-linker (Purow B *et al.*, 2005 ; Parott MB *et al.*, 2003). De même, l'exposition de l'avidine permet l'utilisation de ligands biotinylés pour augmenter la transduction et le ciblage (Purow B *et al.*, 2005 ; Raty JK *et al.*, 2005 ; Raty JK *et al.*, 2006). Alors que les différentes méthodes de modification de capsid pour les adénovirus ont largement été publiées, aucune d'entre elles n'est encore entrée sur le marché.

En modifiant la surface de vecteurs viraux, on se doit de considérer que les modifications de la surface virale peuvent affecter la biodistribution virale et donc, potentiellement affecter la sécurité du patient ; il apparaît donc nécessaire de tester de façon satisfaisante cette biodistribution afin de fournir des données sur les conséquences de ces modifications sur la cinétique virale *in vivo*.

III. Vecteurs viraux et risques liés à l'intégration

a. Exemple tragique 2 : les vecteurs viraux peuvent tuer

Actuellement une seule stratégie, celle employée par Alain Fischer et Marina Cavazzana-Calvo, visant à traiter l'incapacité à développer des réponses immunitaires de nouveau-nés atteints d'immunodéficience sévère (SCID, Severe Combined Immunodeficiency) peut être considérée comme une réussite avec cependant une

situation complexe car cette stratégie est parfois à l'origine d'effets secondaires graves. En 1998-99, de très jeunes enfants atteints du SCID-X souffrant d'une immunodéficience (les "bébé bulles") ont reçu un traitement visant à rendre actif leurs lymphocytes T déficients. Plus précisément, la thérapie consistait à insérer un gène fonctionnel restaurant la fonctionnalité d'un récepteur de l'interleukine 2. La mutation de certaines protéines de ce récepteur empêche ces malades de disposer d'une réaction immunitaire efficace les rendant sensibles à toutes les infections opportunistes. Dans un premier temps, l'entreprise s'est révélée être une réussite totale avec la guérison des patients (Cavazzano-Calvo *et al.*, 2000) : la plupart des bébés ont pu sortir de leur bulle et vivre normalement. Cependant, quatre de ces patients sur la vingtaine d'enfants traités par ce type de thérapie ont développé une leucémie après quelques années. De nombreuses données convergent pour penser que le type de vecteur utilisé pourrait s'intégrer dans des régions sensibles du génome, et en dérégulant certains gènes, comme le proto-oncogène LMO2 (Hacein-Bey-Abina S *et al.*, 2003) (un gène fréquemment retrouvé activé dans des lymphomes naturels) pourrait participer à ces formes de leucémies induites. On peut corréliser cette intégration du vecteur à la multiplication anarchique des globules blancs encore indifférenciés à l'origine de la leucémie. Il s'agirait donc bien d'un effet secondaire directement imputable à la stratégie elle-même, même si le développement de ce type de leucémie n'a pas été décelé dans la majorité des patients impliqués dans les divers essais cliniques de ce type.

b. Vecteurs viraux et intégration au génome

Alors que la transduction par les adénovirus se révèle transitoire et diminue au cours des semaines, les vecteurs rétroviraux et lentiviraux intègrent leurs transgènes dans le génome de l'hôte avec une expression stable dans le temps à moins d'utiliser un promoteur silencieux (Ellis J, 2005). Il a été observé que l'intégration rétrovirale se produit souvent au niveau de sites activement exprimés, présentant alors une menace possible pour le patient. La découverte des leucémies rapportées lors des essais contre le SCID-X utilisant des cellules de moelle osseuse transduites, a provoqué un important débat sur les risques liés à l'utilisation de vecteurs intégratifs (Woods NB *et*

al., 2006 ; Trasher AJ *et al.*, 2006 ; Pike-Overzet K *et al.*,2006). L'intégration rétrovirale proche du promoteur du proto-oncogène LMO-2 semble être la cause de l'apparition de ces deux cas de leucémie (Hacein-Bey-Abina S *et al.*, 2003). Les solutions qui se présentent pour résoudre le problème sont de diriger l'ADN rétroviral vers un site prédéterminé ou d'isoler le promoteur viral avec un isolant de chromatine (Yi Y *et al.*, 2005). Cependant, une étude utilisant une protéine de fusion composée d'une intégrase-HIV et d'une protéine se liant à l'ADN, a montré que des intégrations au hasard se produisaient toujours *in vitro* (Tan W *et al.*, 2006). L'avantage de l'utilisation de vecteurs lentiviraux pour transduire des cellules quiescentes a conduit au développement de vecteur lentiviraux défectifs pour l'intégrase présentant deux mois d'expression *in vitro* (Vargas J Jr *et al.*, 2004) et efficaces *in vivo* (Philippe S *et al.*, 2006).

Des promoteurs spécifiques de tissus ou des activateurs de transcription, comme le facteur induit pas hypoxie (HIF), peuvent être utilisés pour que l'expression du transgène se fasse dans les tissus sélectionnés (Sadeghi H *et al.*, 2005 ; Lee JW *et al.*, 2004). Cette méthode est souvent employée pour compenser le peu de vecteurs viraux spécifiques de cellule, permettant ainsi au vecteur de pénétrer dans des types cellulaire variés et exprimer le transgène uniquement dans les cellules sélectionnées. L'inconvénient de ces promoteurs spécifiques de tissu et de ces facteurs métaboliques est qu'ils sont souvent plus faibles que les promoteurs constitutifs comme le promoteur du cytomégalovirus. Cependant, ils peuvent être modifiés pour obtenir une plus forte expression du gène, par exemple en introduisant une boucle de rétrocontrôle positif en utilisant des activateurs transcriptionnels (Nettelbeck DM *et al.*, 1998) ou en ajoutant des éléments stabilisateurs d'ARN labiles comme le stabilisateur post transcriptionnel du virus de l'hépatite de la marmotte d'Amérique (=WPRE, *Woodchuck hepatitis virus regulation element*) (Lee YB *et al.*, 2005). Finalement il apparaît que les systèmes de promoteurs spécifiques de tissus peuvent apporter une sécurité ajoutée à la thérapie génique, cependant on ne sait toujours pas si la fenêtre thérapeutique peut être atteinte avec toutes ces conditions, en gardant une expression extrêmement spécifique.

B. Utilisation des vecteurs viraux dans l'immunothérapie antitumorale à venir

Les coûts des équipements d'imagerie non invasive, tels que les TEP scan (tomographie par émission de positrons), TEMP scan (tomographie d'émission monophotonique) et IRM (Raty JK *et al.*, 2007) ont diminué, permettant ainsi un accès accru aux chercheurs au développement poussé d'images de vecteurs. Ces images peuvent être un outil valable aussi bien pour son utilité en clinique chez le patient que pour le développement de nouveaux vecteurs ciblant. La capacité à détecter la biodistribution du vecteur et l'expression du gène de traitement pourra être essentielle dans le futur pour surveiller exactement l'efficacité du traitement et la sécurité du patient.

La combinaison des modifications de surface virale et de promoteurs spécifiques semble être un bon moyen de réduire les effets secondaires de l'administration de particules virales *in vivo*. Cependant l'apport de cette spécificité coûte peut être à l'efficacité de transduction. En commençant avec une importante expression et un bon ciblage, la combinaison des deux pourrait, dans l'absolu, être suffisante pour atteindre la fenêtre thérapeutique propre à différentes maladies. Le développement de combinaisons d'approches thérapeutiques pourrait être prometteur dans l'immunothérapie antitumorale.

I. Vecteurs viraux et associations de stratégies

Comme nous l'avons évoqué en troisième partie, l'association de l'utilisation de vecteurs viraux à d'autres stratégies telles que la virothérapie ou les thérapeutiques monoclonales se révèle, dans les études précliniques ou cliniques, souvent plus efficace que les stratégies prises seules.

a. TRICOM

i. **Stratégie**

Des études ont montré que les vecteurs codant pour des molécules immunostrimulatrices et des TAA apportaient de meilleurs résultats, avec une augmentation de la réponse immunitaire dirigée contre le TAA. C'est ce que nous avons évoqué en rapportant l'étude de Chen Y *et al.*, 2001, où le vecteur est porteur du gène de ErbB-2/neu et l'IL-12.

L'approche TRICOM va un peu plus loin en utilisant une triade de molécules de costimulation (*TRIad of Costimulatory Molecules*) qui sont B7-1, ICAM-1 et LFA-3. Cette approche permet d'augmenter la réponse cellulaire T envers un TAA à des niveaux bien plus importants que lors de la combinaison de la présentation de TAA avec une ou deux molécules de costimulation (Aarts WM *et al.*, 2002). De nombreuses études ont déjà été conduites pour démontrer l'efficacité de cette approche avec des TAA, tels que le CEA (antigène carcinoembryonnaire) ou PSA (antigène spécifique de la prostate) utilisant le virus de la vaccine ou d'autres vecteurs poxviraux, rapportées dans l'article de Garnett CT *et al.* en 2006.

ii. **Applications actuelles**

- **ProstvacTM : un vaccin thérapeutique en développement**

ProstvacTM est un vaccin thérapeutique contre le cancer de la prostate au dernier stade de son développement clinique. Il est constitué d'un vecteur recombinant dérivé du virus de la vaccine pour la primo-vaccination, suivi de multiples rappels utilisant un vecteur recombinant dérivé du fowlpox virus. Les deux vecteurs contiennent pour transgènes le PSA et TRICOM. La vaccine portant PSA-TRICOM infecte les CPA qui présentent par la suite le PSA et les molécules de costimulation à leur surface. L'interaction entre ces cellules et les cellules T initie une réponse immunitaire et conduit à une destruction des cellules tumorales.

Les essais clinique de phase I ont indiqué une toxicité négligeable, les essais de phase II ont suggéré une meilleurs survie après le traitement par ProstavacTM, spécialement chez les patients atteints de maladie indolente. Les données précliniques et cliniques indiquent que les radiations, les thérapies hormonales, et chimiothérapie peuvent être combinées à ProstavacTM pour augmenter l'efficacité vaccinale. Un essai clinique de phase III est prévu chez les patients atteints de cancer de la prostate métastatique résistant à la castration (Madan RA *et al.*, 2009).

- **TG4010 : statut « Fast Track » pour le traitement du cancer du poumon**

TG4010 est en cours de développement pour le traitement du cancer du poumon «non à petites cellules» (NSCLC : *non small cell lung cancer*) au stade métastatique, associé à une chimiothérapie de première ligne.

L'obtention du statut « Fast Track » est une nouvelle étape après la validation par la FDA (Food and Drug Administration) de la poursuite du développement clinique dans une étude de phase III, obtenue en juin 2009 après examen des résultats positifs de phase IIb contrôlés.

Le programme « Fast Track » a été mis en place par la FDA pour faciliter le développement et accélérer la revue réglementaire de nouveaux produits à fort potentiel thérapeutique destinés au traitement de maladies graves ou mortelles sans solutions médicales adéquates. Les produits ayant reçu ce label bénéficient généralement d'une revue prioritaire et accélérée du dossier d'autorisation de mise sur le marché de la part de la FDA.

TG4010 est construit à partir d'un virus de la vaccine recombinant exprimant l'antigène MUC1 et IL-2 humaine. TG4010 a pour rôle d'induire des réponses immunitaires à la fois innées et adaptatives. La protéine MUC1 est une mucine hautement glycosylée, trouvée normalement à la surface apicale des cellules épithéliales de nombreux types de tissus. Dans les cellules tumorales, plusieurs modifications de la protéine MUC1 surviennent : surexpression, hypoglycosylation et changements de la localisation cellulaire. Ces changements font de la protéine MUC1 une cible de choix pour l'immunothérapie. TG4010 exprime la totalité de la séquence

de MUC1 et peut donc déclencher une réponse immunitaire contre l'ensemble des épitopes de MUC1. La stratégie consiste donc à induire l'expression de l'antigène MUC1 dans un environnement non tumoral, c'est-à-dire là où le système immunitaire est totalement fonctionnel, afin d'induire une immunité à la fois innée et adaptative.

Par ailleurs, l'immunothérapie s'est focalisée sur la déplétion des LT régulateurs.

b. Inactivation des Treg

i. Définition des Treg

Les lymphocytes T CD4⁺ CD25⁺ régulateurs naturels (Treg) jouent un rôle capital dans le maintien de la tolérance périphérique au soi, leur absence conduisant au développement de syndromes lymphoprolifératifs auto-immuns. Les Treg sont également impliqués dans le contrôle des réponses immunitaires anti-infectieuses et ont un rôle délétère lors des réponses immunitaires antitumorales. Il a été récemment découvert qu'ils se localisaient préférentiellement au niveau des tumeurs, s'accumulant et encombrant la tumeur (Yu P *et al.*, 2005). Il semblerait que les Treg sont impliqués dans les mécanismes d'échappement des tumeurs au système immunitaire (Terabe M *et al.*, 2004).

ii. Vecteurs viraux et Treg : application

Les expériences de déplétion des Treg associée à l'utilisation de vecteurs viraux apportant des gènes d'immunostimulation en sont encore à leurs débuts. Elia *et al.* ont combiné l'utilisation d'un adénovirus porteur du CEA à une déplétion de Treg. Les résultats de cette étude préclinique chez la souris ont montré une diminution des tumeurs primaires et des métastases hépatiques alors qu'aucune réponse n'a été observée dans le groupe vacciné avec juste l'adénovirus porteur du CEA (Elia L *et al.*, 2007).

c. Vaccination double utilisant deux types de vaccin différents dirigés contre le même antigène

(Boehm *et al.*, 2009)

i. Stratégie

Les études comparatives de deux (ou plus) types de vaccins ont historiquement évalué chaque type de vaccin et son habilité à induire une réponse immunitaire, et pu conclure que tel vaccin est plus efficace qu'un autre, conduisant à une recommandation du plus efficace pour le développement d'essais cliniques.

Une étude récente a supposé que l'utilisation de deux types de vaccins concomitant ciblant le même antigène pourrait induire deux populations distinctes et partagées de cellules T spécifiques de l'antigène. Cette étude examine donc la possibilité d'utiliser ensemble deux types de vaccins différents : un poxvirus recombinant et vaccin à base de levures.

ii. Resultats

Cet essai démontre pour la première fois que la vaccination avec un vecteur poxviral recombinant (rV/F-CEA/TRICOM) ou un vaccin à base de levures tuées par la chaleur (yeast-CEA) provoque deux populations de cellules T fonctionnelles, avec des caractéristiques phénotypiques uniques.

L'intérêt de cette étude est la démonstration de la possibilité d'induire une population de cellules T diversifiée, cependant dirigée contre le même antigène et qui conduit à une augmentation de l'efficacité antitumorale. Ainsi, les prochains essais cliniques développeront sans doute cette approche afin de déterminer son utilisation probable chez l'Homme.

Les différents déplorables « accidents » apparus en thérapie génique n'auront que partiellement freiné la recherche dans le domaine de l'immunothérapie antitumorale faisant intervenir les vecteurs viraux. Les différentes études précliniques, lorsqu'elles sont convaincantes, amènent aux essais cliniques qui ne sont parfois pas aussi satisfaisants que prévu. Cependant, les quelques rémissions totales de certains

patients, les améliorations cliniques observées auront été une réelle avancée, pour le patient lui-même et pour la recherche qui ne cesse de progresser, preuve en est le prochain vaccin Prosvac. Aux vues de la complexité des mécanismes tumoraux et immunitaires, de l'interaction entre le vecteur viral et l'hôte, l'apparition d'un produit anticancéreux miracle n'est pas encore d'actualité. Il semblerait néanmoins que l'utilisation de stratégies combinées soit prometteuse.

II. Vecteurs viraux et immunothérapie antitumorale : une application vétérinaire ?

Les vecteurs viraux sont déjà largement utilisés en médecine vétérinaire, non pas dans le domaine de l'immunothérapie antitumorale, mais dans le cadre de médecine préventive. En effet, il existe un certain nombre de vaccins à vecteurs viraux utilisables dans différentes espèces. 12 vaccins basés sur des vecteurs viraux sont couramment utilisés (Tableau 5) et d'autres sont en cours de développement.

Recombinant viral vector	Target pathogen	Target species	Target antigen	Brand name	Distributor
ALVAC (plus tetanus toxoid and Carbopol adjuvant)	Equine influenza virus	Horses	HA (Kentucky and Newmarket strains)	ProteqFlu-Te (Europe) Recombitek (USA)	Merial
ALVAC	West Nile Virus (WNV)	Horses	PreM-Env	Recombitek Equine WNV	Merial
ALVAC	Rabies virus	Cats	Glycoprotein G	Purevax Feline Rabies	Merial
ALVAC	Feline leukaemia virus (FeLV)	Cats	Env, Gag-Pol	Purevax FeLV	Merial
ALVAC	Canine distemper virus	Dogs	HA and F	RECOMBITEK rDistemper	Merial
ALVAC	Canine distemper virus	Ferrets	HA and F	Purevax Ferret Distemper	Merial
Fowlpox virus (FPV)	Avian influenza virus and FPV	Poultry	H5 HA	Trovac AI H5	Merial
FPV	Newcastle disease virus (NDV) and FPV	Poultry	HN and F	Vectormune FP-N	Biomune
Vaccinia virus	Rabies virus	Wildlife	Glycoprotein G	Raboral	Merial
NDV (LaSota strain)	Avian influenza virus and NDV	Poultry	H5 HA	NewH5	Avimex
Flavivirus YFV-17D (live chimeric virus)	WNV	Horses	preM-Env of WNV in YFV-17D backbone	PreveNile	Intervet
HVT (live chimeric virus)	IBDV and Marek's disease virus	Poultry	VP2 of IBDV in HVT backbone	Vaxxitek HVT + IBD	Merial

ALVAC, attenuated canarypox virus; Env, envelope protein; Gag, group-specific antigen; F, fusion antigen; H5 HA, HA from influenza virus H5; HA, haemagglutinin; HN, haemagglutinin-neuraminidase protein; HVT, Turkey herpesvirus; IBDV, infectious bursal disease virus; Pol, polymerase; preM, pre-membrane protein; VP2, viral protein 2; YFV-17D, attenuated yellow fever virus strain 17D.

Tableau 4 : Vaccins vétérinaires à base de vecteurs viraux accrédités pour l'utilisation commerciale

(Draper SJ *et al.*, 2010)

Pourtant ces technologies font encore face à la difficile compétition apportée par les vaccins classiques atténués ou inactivés, qui sont souvent plus faciles à produire. Contrôler l'influenza aviaire représente un véritable challenge économique et requiert des stratégies de vaccination de masse comme l'administration dans l'eau de boisson, par des sprays aérosols ou par immunisation dans l'œuf (Swayne DE *et al.*, 2008). Garder un faible coût de ces voies d'administration, tout en gardant l'efficacité du vaccin est un réel défi pour les technologies de vecteurs viraux recombinants.

L'immunothérapie antitumorale vétérinaire n'existe actuellement pas autrement que dans les essais précliniques ; mais il ne s'agit pas dans ce cas de médecine vétérinaire à proprement parler. Il est déjà bien difficile en pratique, de faire un diagnostic précis d'une quelconque tumeur ou d'un cancer. Quand c'est possible, la décision de chirurgie est souvent prise mais rarement suivie de protocoles de chimiothérapie ou radiothérapie. Ces thérapeutiques, classiques chez l'Homme, ne sont pas très répandues chez l'animal, pour des raisons de motivation, de coût et de résultats pas forcément spectaculaires pour le propriétaire.

Cependant, la cancérologie vétérinaire est un domaine en plein essor avec une médicalisation croissante et un vieillissement des animaux. Les moyens thérapeutiques sont semblables à la médecine humaine : chirurgie carcinologique, chimiothérapie, radiothérapie. L'utilisation d'anticancéreux n'est pas anodine, notamment en ce qui concerne la sécurité de l'environnement et réfrène de nombreux praticiens. Les espèces concernées sont les animaux de compagnie, les chevaux et les NAC. Actuellement l'immunothérapie n'étant pas développée, l'utilisation des vecteurs viraux se limite donc à la vaccinologie dans le cadre de médecine préventive vétérinaire.

Conclusion de la quatrième partie : l'utilisation de vecteurs viraux dans l'immunothérapie antitumorale s'est beaucoup développée ces dernières années. Ce domaine présente des avancées très prometteuses avec la sortie de spécialités commerciales intéressantes mais néanmoins garde des points d'ombre. L'immunothérapie antitumorale comporte de multiples stratégies complexes, faisant

intervenir des vecteurs, qui semblent pouvoir être associées afin d'obtenir de meilleurs résultats.

Conclusion

L'immunothérapie offre de nombreuses stratégies de traitements contre le cancer, toutefois, l'efficacité thérapeutique est encore entravée par un transfert de gène pas toujours efficace. Les vecteurs viraux apparaissent comme de bons véhicules pour les stratégies d'immunothérapie. Ils sont souvent très efficaces ; certains permettent une expression à long terme et d'autres peuvent infecter des cellules en division ou non. Certains ont été identifiés comme des candidats idéaux adaptés à une stratégie particulière ; c'est le cas des vecteurs dérivés du SFV qui présentent des caractéristiques adaptées pour les stratégies vaccinales, alors que les vecteurs AAV assurent une expression longue mais moins importante du transgène, ce qui est idéal pour délivrer des cytokines qui seraient toxiques à haute dose. Les vecteurs viraux apparaissent comme des outils très prometteurs dans l'immunothérapie antitumorale et ont déjà apporté des résultats très intéressants et encourageants dans certains essais précliniques et cliniques, notamment la régression totale d'une tumeur vaginale chez une femme, un exemple parmi tant d'autres. Certaines spécialités sont quasiment prêtes à être utilisées à grande échelle (ProstvacTM), d'autres le sont déjà en Chine (AMM de H101, virus oncolytique).

Cependant il reste encore de nombreuses interrogations concernant l'utilisation de ces vecteurs viraux ; particulièrement le risque inhérent de mutagenèse et l'immunogénicité de ceux-ci, avec en mémoire les différents « accidents » dramatiques survenus lors d'essais cliniques de thérapie génique utilisant des virus. Les efforts s'intensifient pour trouver des solutions à ces obstacles et augmenter la sécurité de leur utilisation. Néanmoins, il ne faut pas perdre de vue que les patients participant aux essais cliniques sont des malades dont l'affection progresse malgré les traitements conventionnels et qu'il s'agit pour la plupart de traitement de la « dernière chance ».

Références bibliographiques

Aarts WM, Schlom J, Hodge JW. Vector-based vaccine/cytokine combination therapy to enhance induction of immune response to a self-antigen and antitumor activity. *Cancer Res* 2002 ; 62 : 5770-7.

Abdel-Wahab Z, et al. Eradication of melanoma pulmonary metastases by immunotherapy with tumor cells engineered to secrete interleukin-2 or gamma-interferon. *Cancer Gene Ther* 1997 ; 4 : 33-41.

Addison CL, Braciak T, Ralston R, Muller WJ, Gauldie J, Graham FL. Intratumoral injection of an adenovirus expressing interleukin-2 induces regression and immunity in a murine breast cancer model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 ; 92 : 8522-6.

Akbulut H, Zhang L, Tang Y, Deisseroth A. Cytotoxic effect of replication-competent adenoviral vectors carrying L-plastin promoter regulated E1A and cytosine deaminase genes in cancers of the breast, ovary and colon. *Cancer Gene Ther* 2003 ; 10 : 388-95.

Alain T, Hirasawa K, Pon KJ, et al. Reovirus therapy of lymphoid malignancies. *Blood* 2002 ; 100 : 4146-53.

Alcami A et Smith GL. Receptors for gamma-interferon encoded by poxviruses: implications for the unknown origin of vaccinia virus. *Trends Microbiol* 1996 ; 4 : 321-6.

Alemanly R, Balague C, Curiel DT. Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biotechnol* 2000 ; 18 : 723-7.

Almand B, Clark JI, Nikitina E, et al. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients : a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* 2001 ; 166 : 678-89.

Ambrosini G, Adida C, and Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997 ; 3 : 917-21.

Anderson BD et al. High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus. *Cancer Res* 2001 ; 61 : 8188-93.

Anderson TD, Hayes TJ. Toxicity of human recombinant interleukin-2 in rats. Pathologic changes are characterized by marked lymphocytic and eosinophilic proliferation and multi-system involvement. *Lab Invest* 1989 ; 60 : 331-46.

Andreansky S, He B, Van Cott J, et al. Treatment of intracranial gliomas in immunocompetent mice using herpes simplex viruses that express murine interleukins. *Gene Ther* 1998 ; 5 : 121-30.

Anson DS. The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks ? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery. *Genet Vaccines Ther* 2004 ; 2 : 9.

Antoine G, Scheiflinger F, Dorner F, Falkner FG. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology* 1998 ; 244 : 365-96.

Aplin AE, Howe A, Alahari SK, and Juliano RL. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 1998 ; 50 : 197-263.

Arakawa S Jr et al. Clinical trial of attenuated vaccinia virus AS strain in the treatment of advanced adenocarcinoma. Report on two cases. *J Cancer Res Clin Oncol* 1987 ; 113 : 95-8.

Arlen PM, Skarupa L, Pazdur M, Seetharam M, Tsang KY, Grosenbach DW, Feldman, et al. Clinical safety of a viral vector based prostate cancer vaccine strategy. *J Urol* 2007 ; 178 : 1515-20.

Ashkenazi A and Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1999 ; 11 : 255-60.

Asselin-Paturel C, Lassau N, Guinebretiere JM, et al. Transfer of the murine interleukin-12 gene *in vivo* by a Semliki Forest virus vector induces B16 tumor regression through inhibition of tumor blood vessel formation monitored by doppler ultrasonography. *Gene Ther* 1999 ; 6 : 606-15.

Atkins GJ, Smyth JW, Fleeton MN, Galbraith SE, Sheahan BJ. Alphaviruses and their derived vectors as anti-tumor agent. *Curr cancer Drug Targets* 2004 ; 4 : 597-607.

Atkins MB. Cytokine-based therapy and biochemotherapy for advanced melanoma. *Clin Cancer Res* 2006 ; 12 (7 Pt 2) : 2353s-58s.

Baekelandt V, Eggermont K, Michiels M, Nuttin B, Debyser Z. Optimized lentiviral vector production and purification procedure prevents immune response after transduction of mouse brain. *Gene Ther* 2003 ; 10 : 1933-40.

Baldwin PJ, Van der Burg SH, Boswell CM, Offringa R, Hickling JK, Dobson J, et al. Vaccinia-expressed human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 as a therapeutic Vaccination for vulval and vaginal intraepithelial neoplasia. *Clin Cancer Res* 2003 ; 9 : 5205-13.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000 ; 18 : 767-811.

- Banchereau J, Steinman RM.** Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998 ; 392 : 245-52.
- Barajas M, Mazzolini G, Genove G, et al.** Gene therapy of orthotopic hepatocellular carcinoma in rats using adenovirus coding for interleukin 12. *Hepatology* 2001 ; 33 : 52-61.
- Barry M, Bleackley RC.** Cytotoxic lymphocytes : all road lead to death. *Nat Immunol* 2002 ; 2 : 401-9.
- Barth Jr RJ, Bock SN, Mule JJ, Rosenberg SA.** Unique murine tumor-associated antigens identified by tumor infiltrating lymphocytes. *J Immunol* 1990 ; 144 : 1531-7.
- Bauzon M, Castro D, Karr M, Hawkins LK, Hermiston TW.** Multigene expression from a replicating adenovirus using native viral promoters. *Mol Ther* 2003 ; 7 : 526-34.
- Baxby D.** Edward Jenner's Inquiry; a bicentenary analysis. *Vaccine* 1999 ; 17 : 301-7.
- Baxevanis CN, Sotiropoulou PA, Sotiriadou NN, Papamichail M.** Immunobiology of Her-2/neu oncoprotein and its potential application i cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2004 ; 53 : 166-75.
- Belkowski LS.** Inhibition of vesicular stomatitis viral mRNA synthesis b interferons. *J Virol* 1987 ; 61 : 653-60.
- Benihoud K, Yeh P and Perricaudet M.** Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol* 1999 ; 10 : 440-7.
- Bergers G and Coussens LM.** Extrinsic regulators of epithelial tumor progression: metalloproteinases. *Curr Opin Genet Dev* 2000 ; 10 : 120-7.
- Bernt KM, Steinwaerder DS, Ni S, Li ZY, Roffler SR, Lieber A.** Enzyme-activated prodrug therapy enhances tumor-specific replication of adenovirus vectors. *Cancer Res* 2002 ; 62 : 6089-98.
- Bessis N, Garcia Cozar FJ, Boissier MC.** Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther* 2004 Suppl 1 ; 11 : 10-17.
- Billingham RE, Brent L, Medawar P.** Actively acquired tolerance of foreign cells. *Transplantation* 1953 ; 76 : 1409-12.
- Bischoff JR et al.** An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 1996 ; 274 : 373-6.
- Bishop JM.** The discovery of proto-oncogenes. *FASEB J* 1996 ; 10 : 362-4.
- Bishop JM and Weinberg RA.** Introduction-molecular oncology. In Bishop JM and Weinberg RA Molecular Oncology. *New-York Scientific American.* 1996.

- Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y *et al.*** T lymphocyte-directed gene therapy for ADASCID: initial trial results after 4 years. *Science* 1995 270 : 475-80.
- Blagosklonny MV.** How carcinogens (or telomere dysfunction) induce genetic instability: associated-selection model. *FEBS Lett* 2001 ; 506 : 169-72.
- Blattman JN, Greenberg PD.** Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. *Science* 2004 ; 305 : 200-205.
- Bluming AZ et Ziegler JL.** Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection. *Lancet* 1971 ; 2 : 105-6.
- Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, Kaiser HE.** Failure of cancer vaccines : the significant limitations of this approach to immunotherapy. *Anticancer Res* 2000 ; 20 : 2665-76.
- Bodnar AG *et al.*** Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998 ; 279 : 349-52.
- Boehm AL, Favre N, Moutet M, *et al.*** Concurrent vaccination with two distinct vaccine platforms targeting the same antigen generates phenotypically and functionally distinct T-cell populations. *Cancer Immunol Immunother* 2009 ; 16 : [Epub ahead of print].
- Bonotte B, Favre N, Moutet M, *et al.*** Bcl2-mediated inhibition of apoptosis prevents immunogenicity and restores tumorigenicity of spontaneously regressive tumors. *J Immunol* 1998 ; 161 : 1433-8.
- Boon T, Brichard VG, Eynde BVD.** Antigènes de rejet des tumeurs et immunothérapie spécifique du cancer. *Med Sci* 1995 ; 11 : 1279-87.
- Bokowski RM.** Natural history and therapy of metastatic renal cell carcinoma, The rôle of interleukin-2. *Cancer* 1997 ; 80 : 1198-220.
- Borrello I, Pardoll D.** GM-CSF-based cellular vaccines : a review of the clinical experience. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002 ; 13 : 185-93.
- Bournnell MEG, Entwistle C, Blakeley D, Roberts C, Duncan IA, Mc Lean CS.** A genetically inactivated herpes simplex virus type 2 (HSV-2) vaccine provides effective protection against primary and recurrent HSV-2 disease. *J Infect Dis* 1997 ; 175 : 16-25.
- Brachner A, *et al.*** Telomerase- and alternative telomere lengthening-independent telomere stabilization in a metastasis-derived human non-small cell lung cancer cell line: effect of ectopic hTERT. *Cancer Res* 2006 ; 66 : 3584-92.
- Bristol JA, Zhu M, Ji H, *et al.*** *In vitro* and *in vivo* activities of an oncolytic adenoviral vector designed to express GM-CSF. *Mol Ther* 2003 ; 7 : 755-64.

- Broyles SS.** A role for ATP hydrolysis in vaccinia virus early gene transcription. Dissociation of the early transcription factor-promoter complex. *J Biol Chem* 1991 ; 266 : 15545-8.
- Bui LA, et al.** In vivo therapy of hepatocellular carcinoma with a tumor-specific adenoviral vector expressing interleukin-2. *Hum Gene Ther* 1997 ; 8 : 2173-82.
- Buchschacher GL Jr and Wong-Staal F.** Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood* 2000 ; 95 ; 2499-504.
- Bull HA, Brickell PM and Dowd PM.** Src-related protein tyrosine kinases are physically associated with the surface antigen CD36 in human dermal microvascular endothelial cells. *FEBS Lett* 1994 ; 351 : 41-4.
- Buller RM, Smith GL, Cremer K, Notkins AL, Moss B.** Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype. *Nature* 1985 ; 317 : 813-5.
- Burnet FM.** A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Austr J Sci* 1957 ; 20 : 67-70.
- Burton EA, Bai Q, Goins WF, and Glorioso JC.** Replication-defective genomic herpes simplex vectors: design and production. *Curr Opin Biotechnol* 2002 ; 13 : 424-8.
- Buzdar AU, Valero V, Ibrahim NK, et al.** Neoadjuvant therapy with paclitaxel followed by 5-fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide chemotherapy and concurrent trastuzumab in huma epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer : an update of the initial randomized study population and data of additional patients treated with the same regimen. *Clin Cancer Res* 2007 ; 13 : 228-33.
- Cai WH, Gu B, and Person S.** Role of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 in viral entry and cell fusion. *J Virol* 1988 ; 62 : 2596-604.
- Cairns J.** The initiation of vaccinia infection. *Virology* 1960 ; 11 : 603-23.
- Cantrell D.** T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu Rev Immunol* 1996 ; 14 : 259-74.
- Cao X et al.** Lymphotactin gene-modified bone marrow dendritic cells act as more potent adjuvants for peptide delivery to induce specific antitumor immunity. *J Immunol* 1998 ; 161: 6238-6244.
- Carette JE, Graat HC, Schagen FH, Abou El Hassan MA, Gerritsen WR, van Beusechem VW.** Replication dependent transgene expression from a conditionally replicating adenovirus via alternative splicing to a heterologous splice-acceptor site. *J Gene Med* 2005 ; 7: 1053-62.
- Carew JF et al.** A novel approach to cancer therapy using an oncolytic herpes virus to package amplicons containing cytokine genes. *Mol Ther* 2001 ; 4 : 250-6.
- Carmeliet P and Collen D.** Transgenic mouse models in angiogenesis and

cardiovascular disease. *J Pathol* 2000 ; 190 : 387-405.

Carroll M. The relevance of basic sciences learning objectives to clinical practice. *Med Educ* 2003 ; 37 : 946-7.

Carroll MW et Moss B. Poxviruses as expression vectors. *Curr Opin Biotechnol* 1997 ; 8 : 573-7.

Caruso M, Pham-Nguyen K, Kwong YL, et al. Adenovirus mediated interleukin-12 gene therapy for metastatic colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 11302-6.

Cassel WA, Murray DR. A ten-year follow-up on stage II malignant melanoma patients treated postsurgically with Newcastle disease virus oncolysate. *Med Oncol Tumor Pharmacother* 1992 ; 9 : 169-71.

Catros-Quemener V, Bouet F, Genetet N. Immunité antitumorale et thérapies cellulaires du cancer. *Med Sci* 2003 ; 19 : 43-53.

Caudell EG, Mumm JB, Poindexter N, Ekmekcioglu S, Mhashilkar AM, Yang XH, et al. The protein product of the tumor suppressor gene, melanoma differentiation-associated gene 7, exhibits immunostimulatory activity and is designated IL-24. *J Immunol* 2002 ; 168(12) : 6041-6.

Cavazzano-Calvo M, Hacein-Bey S, De Saint Basile G, Gross F et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000 ; 288 : 669-72.

Chang J, Zhao X, Wu X, Guo Y, Guo H, Cao J, Guo Y, Lou D, Yu D, Li J. A phase I study of KH901, a conditionally replicating granulocyte-macrophage colony-stimulating factor : armed oncolytic adenovirus for treatment of head and neck cancers. *Cancer Biol Ther* 2009 ; 8 (8) : 676-82.

Chen L, Ashe S, Brady WA, et al. Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecule CD28 and CTLA-4. *Cell* 1992 ; 71 : 1093-102.

Chen Y, Emtage P, Zhu Q, et al. Induction of ErbB-2/neu-specific protective and therapeutic antitumor immunity using genetically modified dendritic cells : enhanced efficacy by cotransduction of gene encoding IL-12. *Gene Ther* 2001 ; 8 : 316-23.

Chikkanna-Gowda CP, Sheahan BJ, Fleeton MN, Atkins GJ. Regression of mouse tumors and inhibition of metastases following administration of a Semliki Forest virus vector with enhanced expression of IL-12. *Gene Ther* 2005 ; 12 : 1253-63.

Chillon M, Lee JH, Fasbender A, Welsh MJ. Adenovirus complexed with polyethylene glycol and cationic lipid is shielded from neutralizing antibodies *in vitro*. *Gene Ther*

1998 ; 5 : 995-1002.

Chirmule N, Propert K, Magosin S, Qian Y, Qian R, Wilson J. Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther* 1999 ; 6 : 1574-83.

Choi KJ, Kim JH, Lee YS, et al. Concurrent delivery of GM-CSF and B7-1 using an oncolytic adenovirus elicits potent antitumor effect. *Gene Ther* 2006 ; 13 : 1010-20.

Choi VW, McCarty DM, Samulski RJ. AAV hybrid serotypes: improved vectors for gene delivery. *Curr Gene Ther* 2005 ; 5 : 299-310.

Chouaib S, Asselin-Paturel C, Mami-Chouaib F, Caignard A, Blay JY. The host-tumor immune conflict : from immunosuppression to resistance and destruction. *Immunol Today* 1997 ; 18 : 493-7.

Christinck ER, Luscher MA, Barber BH et Williams DB. Peptide binding to class I MHC on living cells and quantitation of complexes required for CTL lysis. *Nature* 1991 352(6330) : 67-70.

Christofori G and Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* 1999 ; 24 : 73-6.

Chroboczek J, Bieber F, and Jacrot B. The sequence of the genome of adenovirus type 5 and its comparison with the genome of adenovirus type 2. *Virology* 1992 ; 186 : 280-5.

Chuang CM, Monie A, Wu A, Pai SI, Hung CF. Combination of viral oncolysis and tumor-specific immunity to control established tumors. *Clin Cancer Res* 2009 ; 15 : 4581-88.

Clayman GL, Liu TJ, Overholt M. Gene therapy for head and neck cancer: comparing the tumor processor gene p53 and a cell regulator WAF1/CIP1(p21). *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996 ; 122 : 489-93.

Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2 overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999 ; 17 : 2639-48.

Cochrane AW, Chen CH, and Rosen CA. Specific interaction of the human immunodeficiency virus Rev protein with a structured region in the env mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 ; 87 : 1198-202.

Coebergh J.W. Cancer burden in Europe for 1990: can we predict the figures for the year 2000? *Eur J Cancer* 1997 ; 33 : 991-6.

Coffey MC, Strong JE, Forsyth PA, LeePW. Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science* 1998 ; 282 : 1332-4.

- Cohen CJ, Zheng Z, Bray R, Zhao Y, Sherman LA, Rosenberg SA, Morgan RA.** Recognition of fresh human tumor by human peripheral blood lymphocytes transduced with a bicistronic retroviral vector encoding a murine anti-p53 TCR. *J Immunol* 2005 ; 175 : 5799-808.
- Cohen CJ, Zhao Y, Zheng Z, Rosenberg SA, Morgan RA.** Enhanced antitumor activity of murine-human hybrid T-cell receptor (TCR) in human lymphocytes is associated with improved pairing and TCR/CD3 stability. *Cancer Res* 2006 ; 66 : 8878-86.
- Colditz G.A.** From epidemiology to cancer prevention: implications for the 21st Century. *Cancer Causes Control* 2007 ; 18 : 117-23.
- Colditz GA, Sellers TA, and Trapido E.** Epidemiology - identifying the causes and preventability of cancer ? *Nat Rev Cancer* 2006 ; 6 : 75-83.
- Collins SA, Guinn B, Harrison PT, Scallan MF, O'Sullivan GC, Tangney M.** Viral vectors in cancer immunotherapy : which vector for which strategy ? *Curr Gene Therap* 2008 ; 8 : 66-78.
- Compagni A and Christofori G.** Recent advances in research on multistage tumorigenesis. *Br J Cancer* 2000 ; 83 : 1-5.
- Connor JH, Koumenis C, Lyles DS.** Replication and cytopathic effect of oncolytic vesicular stomatitis virus in hypotoxic tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *J virol* 2004 ; 78 : 8960-70.
- Copier J, Dalgeish A.** Overview of tumor cell-based vaccines. *Int Rev Immunol* 2006 ; 25 : 297-319.
- Cordon-Cardo C and Prives C.** At the crossroads of inflammation and tumorigenesis. *J Exp Med* 1999 ; 190 : 1367-70.
- Couzin J, Kaiser J.** Gene therapy.As Gelsinger case ends, gene therapy suffers another blow. *Science* 2005 ; 307 : 1028.
- Cronin J, Zhang XY, Reiser J.** Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Curr Gene Ther* 2005 ; 5 : 387-98.
- Cross D, Burmester JK.** Gene therapy for cancer treatment : past, present and future. *Clin Med Res* 2006 Sep ; 4(3) : 218-27.
- Croyle MA, Chirmule N, Zhang Y, Wilson JM.** "Stealth" adenoviruses blunt cell-mediated and humoral immune responses against the virus and allow for significant gene expression upon readministration in the lung. *J Virol* 2001 ; 75 : 4792-801.
- Croyle MA, Chirmule N, Zhang Y, Wilson JM.** PEGylation of E1-deleted adenovirus vectors allows significant gene expression on readministration to liver. *Hum Gen Ther* 2002 ; 13 : 1887-900.

Croyle MA, Le HT, Linse KD, et al. PEGylated helper-dependent adenoviral vectors : highly efficient vectors with an enhanced safety profile. *Gen Ther* 2005 ; 12 : 579-87.

Csatary LK, et al. MTH-68/H oncolytic viral treatment in human high-grade gliomas. *J Neurooncol* 2004 ; 67 : 83-93.

Cuensa A, Cheng F, Wang H, Brayer J, Horna P, Gu L et al. Extra-lymphatic solid tumor growth is not immunologically ignored and results in early induction of antigen-specific T-cell anergy : dominant role of cross-tolerance to tumor antigens. *Cancer Res* 2003 ; 63 : 9007-15.

Cunningham CC, Chada S, Merritt JA, et al. Clinical and local biological effects of an intratumoral injection of mda-7 (IL24; INGN 241) in patients with advanced carcinoma: a phase I study. *Mol Ther* 2005 ; 11 : 149-59.

D'Angelica M, Karpoff H, Halterman M, et al. *In vivo* interleukine-2 gene therapy of established tumors with herpes simplex amplicon vectors. *Cancer Immunol Immunother* 1999 ; 47 : 265-71.

Datto MB, Hu PP, Kowalik TF, Yingling J, and Wang XF. The viral oncoprotein E1A blocks transforming growth factor beta-mediated induction of p21/WAF1/Cip1 and p15/INK4B. *Mol Cell Biol* 1997 ; 17 : 2030-7.

Davis MM. Et Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 1988 ; 334 (6181): 395-402.

Davis MM, Boniface JJ, Reich Z, Lyons D, Hampl J, Arden B et Chien Y. Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998 ; 16 : 523-44.

De Gruijl F.R. Skin cancer and solar UV radiation. *Eur J Cancer* 1999 ; 35 : 2003-9.

Deleu L, Faisst S, Rommeare J. Action oncolytique des parvovirus de rongeurs. *Virologie* 2002 ; 1 : 29-40.

DeLuca N, Bzik D, Person S, and Snipes W. Early events in herpes simplex virus type 1 infection: photosensitivity of fluorescein isothiocyanate-treated virions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981 ; 78 : 912-6.

Deng Y and Chang S. Role of telomeres and telomerase in genomic instability, senescence and cancer. *Lab Invest* 2007 ; 87 : 1071-6.

Deveraux QL and Reed JC. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999 ; 13 : 239-52.

De Weese TL et al. A phase I trial of CV706, a replication-competent, PSA selective oncolytic adenovirus, for the treatment of locally recurrent prostate cancer following radiation therapy. *Cancer Res* 2001 ; 61 : 6428-36.

Dilloo D, Rill D, Entwistle C, et al. A novel herpes vector for the high efficiency transduction of normal and malignant human hematopoietic cells. *Blood* 1997 ; 89 :

119-27.

Divino CM, Chen SH, Yang W, et al. Anti-tumor immunity induced by interleukin-12 gene therapy in metastatic model of breast cancer is mediated by natural killer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2000 ; 60 : 129-34.

Doms RW, Blumenthal R, and Moss B. Fusion of intra- and extracellular forms of vaccinia virus with the cell membrane. *J Virol* 1990 ; 64 : 4884-92.

Donahue RE, Kessler SW, Bodine D, et al. Helper virus induced T-cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *J Exp Med* 1992 ; 176 : 1125-35.

Donsante A, Miller DG, Li Y, Vogler C, Brunt EM, Russell DW, Sands MS. AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science* 2007 ; 317 : 477.

Downward J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* 1998 ; 10 : 262-7.

Drabick JJ, Glasspool-Malone J, King A, Malone RW. Cutaneous transfection and immune responses to intradermal nucleic acid vaccination are significantly enhanced by *in vivo* electroporation. *Mol Ther* 2001 ; 3 : 249-55.

Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004 ; 4 : 11-22.

Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, et al. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 3359-43.

Draper DJ, Heeney JL. Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer. *Nat Rev Microbiol* 2010 ; 8 : 62-73.

Dreno B, Nguyen JM, Khammari A, et al. Randomized trial of adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrated lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 2002 ; 51 : 539-46.

Drillien R, Spehner D, Autran B, Garin D. Les poxvirus : une famille de vecteurs. *Virologie* 2003 ; 7 : 243-53.

Dudley ME et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 2002 ; 298 : 850-4.

Dudley ME et al. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 2346-57.

- Dullaers M, Breckpot K, Van Meirvenne S, Bonehill A et al.** Side-by-side comparison of lentivirally transduced and mRNA-electroporated dendritic cells : implication for cancer immunotherapy protocols. *Mol Ther* 2004 ; 10 : 768-79.
- Dullaers M, Van Meirvenne S, Heirman C, Straetman L, Bonehill A, Aerts JL, Thielemans K.** Induction of effective therapeutic antitumor immunity by direct *in vivo* administration of lentiviral vectors. *Gene Ther* 2006 ; 13 : 630-40.
- Dummer R, Rochlitz C, Velu T, Acres B, Limacher JM et al.** Intralesional adenovirus-mediated interleukin-2 gene transfer for advanced solid cancers and melanoma. *Mol Ther* 2008 ; 16 : 985-94.
- Dummer R, Hassel JC, Fellenberg F, Eichmüller S, Maier T, Slos P et al.** Adenovirus-mediated intralesional interferon- γ gene transfer induces tumor regressions in cutaneous lymphomas. *Blood* 2004 ; 104 : 1631–1638.
- Dyall J, Latouche JB, Schnell S, Sadelain M.** Lentivirus-transduced human monocyte-derived dendritic cells efficiently stimulate antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 2001 ; 97 : 114-21.
- Dyson N, Howley PM, Munger K, and Harlow E.** The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989 ; 243 : 934-7.
- Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J.** Gene therapy clinical trials worldwide to 2007-an update. *J Gene Med* 2007 ; 9 : 833-42.
- Eder JP, Kantoff PW, Roper K, et al.** A phase I trial of a recombinant vaccinia virus expressing prostate-specific antigen in advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2000 ; 6 : 1632-8.
- Elia L, Aurisicchio L, Facciabene A, et al.** CD4+CD25+ regulatory-T-cell-inactivation in combination with adenovirus vaccines enhances T-cell responses and protects mice from tumor challenge. *Cancer Gene Ther* 2007 ; 14 : 201-10.
- Ellis J.** Silencing and variegation of gammaretrovirus and lentivirus vectors. *Hum Gene Ther* 2005 ; 16 : 1241-46.
- El-Serag HB, Rudolph KL.** Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007 ; 132 : 2557-76.
- Epstein AL, Marconi P, Argnani R, Manservigi R.** HSV-1-derived recombinant and amplicon vectors for gene transfer and gene therapy. *Curr Gene Ther* 2005 ; 5 : 445-58.
- Esslinger C, Chapatte L, Finke D, et al.** *In vivo* administration of a lentiviral vaccine targets DCs and induces efficient CD8+ T cell responses . *J Clin Invest* 2003 ; 111 : 1673-81.

- Esteban M et Holowczak JA.** Replication of vaccinia DNA in mouse L cells. III. Intracellular forms of viral DNA. *Virology* 1977 ; 82 : 308-22.(a)
- Esteban M et Holowczak JA.** Replication of vaccinia DNA in mouse L cells. I. In vivo DNA synthesis. *Virology* 1977 ; 78 : 57-75.(b)
- Esteban M et Holowczak JA.** Replication of vaccinia DNA in mouse L cells. II. In vitro DNA synthesis in cytoplasmic extracts. *Virology* 1977 ; 78 : 76-86.(c)
- Evan G and Littlewood T.** A matter of life and cell death. *Science* 1998 ; 281 : 1317-22.
- Fearon ER, et al.** Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. *Cell* 1990 ; 60 : 397-403.
- Fedi P, Tronik SR, Aaronson SA.** Growth factors in cancer medicine. *Baltimore, MD, Williams and Wilkins Eds* . 1997.
- Ferlay J, et al.** Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2005 ; 18 : 581-92.
- Fyfe G, Fisher RI, Rosenberg SA, Sznol M, Parkinson DR, Louie AC.** Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy. *J Clin Oncol* 1995 ; 13 : 688-96.
- Firat H, Zennou V, Garcia-Pons F, Ginhoux F, et al.** Use of a lentiviral flap vector for induction of CTL immunity against melanoma. Perspectives for immunotherapy. *J Gen Med* 2002 ; 4 : 38-45.
- Fisher PB, Gopalkrishnan RV, Chada S, Ramesh R, Grimm EA, Rosenfeld MR, et al.** mda-7/IL-24, a novel cancer selective apoptosis inducing cytokine gene: from the laboratory into the clinic. *Cancer Biol Ther* 2003 ; 4 Suppl 1 : S23-37.
- Flinterman M, Gaken J, Farzaneh F, and Tavassoli M.** E1A-mediated suppression of EGFR expression and induction of apoptosis in head and neck squamous carcinoma cell lines. *Oncogene* 2003 ; 22 : 1965-77.
- Foley KP and Eisenman RN.** Two MAD tails: what the recent knockouts of Mad1 and Mxi1 tell us about the MYC/MAX/MAD network. *Biochim Biophys Acta* 1999 ; 1423 : M37-47.
- Folkman J.** Addressing tumor blood vessels. *Nat Biotechnol* 1997 ; 15 : 510.
- Foulds L.** The experimental study of tumor progression. Volume I-III. *London, Academic Press* 1954.
- Fournillier A et al.** An accelerated vaccine schedule with a poly-antigenic hepatitis C virus MVA-based candidate vaccine induces potent, long lasting and in vivo cross-reactive T cell responses. *Vaccine* 2007 ; 25 : 7339-53 (2007).

Fraefel C, Jacoby DR, and Breakefield XO. Herpes simplex virus type 1-based amplicon vector systems. *Adv Virus Res* 2000 ; 55 : 425-51.

Freytag SO et al. Efficacy and toxicity of replication-competent adenovirus-mediated double suicide gene therapy in combination with radiation therapy in an orthotopic mouse prostate cancer model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002 ; 54 : 873-85.

Fuller AO, Santos RE, and Spear PG. Neutralizing antibodies specific for glycoprotein H of herpes simplex virus permit viral attachment to cells but prevent penetration. *J Virol* 1989 ; 63 : 3435-43.

Furukawa K, et al. Effect of virus-modified tumor cells extracts, autologous mononuclear cell infusions and interleukine-2 on oncolytic activity of effector cells of patient with advanced ovarian cancer. *Cancer immunol immunother* 1989 ; 30 : 126-32.

Garnett CT, Greiner JW, Tsang KY, et al. TRICOM vector based cancer vaccines. *Curr Pharm Des* 2006 ; 12 : 351-61.

Gansbacher B, Zier K, Daniels B, Cronin K, Bannerji R, Gilboa E. Interleukin-2 gene transfer into tumor cells abrogates tumorigenicity and induces protective immunity. *J Exp Med* 1990 ; 172 : 1217-24.

Gately S et al. The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 ; 94 : 10868-72.

Geutskens SB, Van der Eb MM, Plomp AC, Jonges LE, Cramer SJ, Ensink NG, Kuppen PJK, Hoeben RC. Recombinant adenoviral vectors have adjuvant activity and stimulate T cell responses against tumors cells. *Gen Ther* 2000 ; 7 : 1410-16.

Ghosh SS, Gopinath P, Ramesh A. Adenoviral vectors: a promising tool for gene therapy. *Appl Biochem Biotechnol* 2006 ; 133 : 9-29.

Giancotti FG and Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999 ; 285 : 1028-32.

Gilboa E. Immunotherapy of cancer with modified tumor vaccines. *Semin Oncol* 1996 ; 23 : 101-7.

Gilboa E. The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity* 1999 ; 11 : 263-70.

Gnant MF, Puhmann M, Alexander HR Jr, Bartlett DL. Systemic administration of a recombinant vaccinia virus expressing the cytosine deaminase gene and subsequent treatment with 5-fluorocytosine leads to tumor-specific gene expression and prolongation of survival in mice. *Cancer Res* 1999 ; 59 : 3396-403.

Goldenberg DM, Sharkey RM, Primus FJ. Carcinoembryonic antigen in histopathology : immunoperoxidase staining of conventional tissue sections. *J Natl Cancer Inst* 1976 ; 57 : 11-22.

- Gomella LG *et al.*** Phase I study of intravesical vaccinia virus as a vector for gene therapy of bladder cancer. *J Urol* 2001 ; 166 : 1291-5.
- Gomez-Gutierrez JG, Elpek KG, Montes de Oca-Luna R, *et al.*** Vaccination with an adenoviral vector expressing calreticulin-human papillomavirus 16 E7 fusion protein eradicates E7 expressing established tumors in mice. *Cancer Immunol Immunother* 2006 ; 55 : 958-68.
- Goncalves MA.** Adeno-associated virus : from defective virus to effective vector. *Virology* 2005 ; 2 : 43.
- Goodrum FD, Ornelles DA.** P53 status does not determine outcome of E1B-55kD mutant adenovirus lytic infection. *J Virol* 1998 ; 72 : 9479-90.
- Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML.** The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 1999 285 (5425) : 221-7.
- Green LL, Hardy MC, Maynard-Currie CE, *et al.*** Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat Genet* 1994 ; 7 : 13-21.
- Grieger JC, Samulski RJ.** Adeno-associated virus as a gene therapy vector: vector development, production and clinical applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2005 ; 99 : 119-45.
- Gromeier M *et al.*** Intergeneric poliovirus recombinants for the treatment of malignant glioma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 : 6803-8.
- Guo ZS *et al.*** The enhanced tumor selectivity of an oncolytic vaccinia lacking the host range and antiapoptosis genes SPI-1 and SPI-2. *Cancer Res* 2005 ; 65 : 9991-8.
- Haag A, Menten P, Van Damme J, *et al.*** Highly efficient transduction and expression of cytokine genes in human tumor cells by means of autonomous parvovirus vectors ; generation of antitumor responses in recipient mice. *Hum Gene Ther* 2000 ; 11 : 597-609.
- Hacein-Bey-Abina S, Fischer A, Cavazzano-Calvo M *et al.*** LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003 ; 302 : 415-19.
- Haddada H, Ragot T, Cordier L, Duffour MT, Perricaudet M.** Adenoviral interleukin-2 gene transfer into P815 tumor cells abrogates tumorigenicity and induces antitumoral immunity in mice. *Hum Gene Ther* 1993 ; 4 : 703-11.
- Hagedorn M and Bikfalvi A.** Target molecules for anti-angiogenic therapy: from basic research to clinical trials. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000 ; 34 : 89-110.
- Halbert CL, Miller AD, McNamara S, Emerson J, Gibson RL, Ramsey B, Aitken ML.**

Prevalence of neutralizing antibodies against adenoassociated virus (AAV) types 2, 5, and 6 in cystic fibrosis and normal populations: implications for gene therapy using AAV vectors. *Hum Gene Ther* 2006 ; 17 : 440-7.

Hallenbeck PL et al. A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Hum Gene Ther* 1999 ; 10 : 1721-33.

Hanahan D et Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000 ; 100 : 57-70.

Hanahan D et Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996 ; 86 : 353-64.

Harding CV et Unanue ER. Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. *Nature* 1990 ; 346(6284) : 574-6.

Harding JA, Engbers CM, Newman MS, Goldstein NI, Zalipsky S. Immunogenicity and pharmacokinetic attributes of poly-(ethylene glycol)-grafted immunoliposomes. *Biochim Biophys Acta* 1997 ; 1327 : 181-92.

Harries M et Smith I. The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin). *Endocr Relat Cancer* 2002 ; 9 : 75-85.

Harrop R, Carroll MW. Viral vectors for cancer immunotherapy. *Front Biosci* 2006 ; 11 : 804-17.

Hawkins LK, Johnson L, Bauzon M, et al. Gene delivery from the E3 region of replicating human adenovirus: evaluation of the 6.7 K/gp19 K region. *Gene Ther* 2001 ; 8 : 1123-31.

Hayakawa M, Kawaguchi S, Ishii S, et al. B7-1-transfected tumor vaccine counteracts chemotherapy-induced immunosuppression and prolongs the survival of rats bearing highly metastatic osteosarcoma cells. *Int J Cancer* 1997 ; 71 : 1091-102.

Hayflick L. Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry Moscow* 1997 ; 62 : 1180-90.

Hecht JR, Bedford R, Abbruzzese JL, et al. A phase I/II trial of intratumoral endoscopic ultrasound injection of ONYX-015 with intravenous gemcitabine in unresectable pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003 ; 9 : 555-61.

Heise C, Williams A, McCormick F, Von Hoff DD, Kirn DH. ONYX-015, an E1B gene attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nature Med* 1997 ; 3 : 639-45.

Heise C et al. An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic antitumoral efficacy. *Nat Med* 2000 ; 6 : 1134-9.

Hellebrand E, Mautner J, Reisbach G, Nimmerjahn F, Hallek M, Mocikat R,

- Hammerschmidt W.** Epstein-Barr virus-mediated gene transfer into human B cells : potential for antitumor vaccination. *Gene Ther* 2006 ; 13 : 150-62.
- Hemminki A, et al.** Targeting oncolytic adenoviral agents to the epidermal growth factor pathway with a secretory fusion molecule. *Cancer Res* 2001 ; 61 : 6377-81.
- Hermiston TW et Kuhn I.** Armed therapeutic viruses: strategies and challenges to arming oncolytic viruses with therapeutic genes. *Cancer Gene Ther* 2002 ; 9 : 1022-35.
- Herrero YCM, Cornelis JJ, Herold-Mende C, et al.** Parvovirus H-1 infection of human glioma cells leads to complete viral replication and efficient cell killing. *Int J Cancer* 2004 ; 46 : 2127-33.
- Heyde M, Partridge KA, Oreffo RO, Howdle SM, Shakesheff KM, Garnett MC.** Gene therapy used for tissue engineering applications. *J Pharm Pharmacol* 2007 ; 59 : 329-50.
- Homa FL and Brown JC.** Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Rev Med Virol* 1997 ; 7 : 107-122.
- Hill C and Doyon F.** [The frequency of cancer in France: mortality trends since 1950 and summary of the report on the causes of cancer]. *Bull Cancer* 2008 ; 95 : 5-10.
- Harris CC.** Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst* 1996 ; 88 : 1442-55.
- Hirasawa K, Nishikawa SG, Norman KL, et al.** Oncolytic reovirus against ovarian and colon cancer. *Cancer Res* 2002 ; 62 : 1696-701.
- Hirasawa K, et al.** Systemic reovirus therapy of metastatic cancer in immune-competent mice. *Cancer Res* 2003 ; 63 : 348-53.
- Holowczak JA.** Uncoating of poxviruses. I. Detection and characterization of subviral particles in the uncoating process. *Virology* 1972 ; 50 : 216-32.
- Holt SE and Shay JW.** Role of telomerase in cellular proliferation and cancer. *J Cell Physiol* 1999 ; 180 :10-8.
- Horig H, Lee CS, Kaufman HL.** Prostate-specific antigen vaccines for prostate cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2002 ; 2 : 395-408.
- Howley P.** Papillomaviridae : the viruses and their replication. In : Fields BN, Knipe DM, HowleyPM, eds. *Virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996 : 2045-76.
- Hruby DE et Ball LA.** Mapping and identification of the vaccinia virus thymidine kinase gene. *J Virol* 1982 ; 43 : 403-9.
- Huang PS and Heimbrook DC.** Oncogene products as therapeutic targets for cancer. *Curr Opin Oncol* 1997 ; 9 : 94-100.

- Hudis CA.** Trastuzumab mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* 2007 ; 357 : 39-51.
- Hudson PJ, Souriau C.** Engineered antibodies. *Nat Med* 2003 ; 9 : 129-34.
- Hughes V.** Therapy on trial. *Nat Med* 2007 ; 13 : 1008-9.
- Hughes MS, Yu YY, Dudley ME, et al.** Transfer of a TCR gene derived from a patient with a marked antitumor response conveys highly active T-cell effector functions. *Hum Gene Ther* 2005 ; 16 : 457-72.
- Hunter-Craig I, Newton KA, Westbury G, Lacey BW.** Use of vaccinia virus in the treatment of metastatic malignant melanoma. *Br Med J* 1970 ; 2 : 512-5.
- IARC.** Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans, human papillomavirus. Vol 64, *International Agency for Research on Cancer*, Lyon, 1995 : 1-378.
- Ikeda K, Ichikawa T, Wakimoto H, et al.** Oncolytic virus therapy of multiple tumors in the brain requires suppression of innate and elicited antiviral responses. *Nat Med* 1999 ; 5 : 881-7.
- Imbault-Huart Marie-José.** Histoire du Cancer. *Histoire* 1985 ; 74.
- Imler JL.** Adenovirus vectors as recombinant viral vaccines. *Vaccine* 1995 ; 13 : 1143-51.
- Immonen A, Vapalahti M, Tyynela K, Hurskainen H, Sandmair A, Vanninen R, et al.** AdvHSVtk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study. *Mol Ther* 2004 ; 10 : 967-72.
- Iruela-Arispe ML and Dvorak HF.** Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. *Thromb Haemost* 1997 ; 78 : 672-7 (1997).
- Jackson GG, Muldoon RL.** Viruses causing common respiratory infection in man. IV. Reoviruses and adenoviruses. *J Infect Dis* 1973 ; 128 : 811-66.
- Jain RK, Baxter LT.** Mechanisms of heterogeneous distribution of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors : significance of elevated interstitial pressure. *Cancer Res* 1988 ; 48 : 7022-32.
- Janeway CA Jr.** Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1989 ; 54 : 1-13.
- Jemal A et al.** Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008 ; 58 : 71-96.
- Jerne NK.** The natural selection theory of antibody formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1955 ; 41 : 849-57.
- Jiang M, Shi W, Zhang Q, Wang X, Guo M, Cui Z, Su C, Yang Q, et al.** Gene therapy

using adenovirus-mediated full-length anti-HER-2 antibody for HER-2 overexpression cancers. *Clin Cancer Res* 2006 ; 12 : 6179-85.

Jin F, Kretschmer PJ, Hermiston TW. Identification of novel insertion sites in the Ad5 genome that utilize the Ad splicing machinery for therapeutic gene expression. *Mol Ther* 2005 ;12 :1052-63.

Johnson JP. Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev* 1991 ; 10 : 11-22.

Joklik WK et Becker Y. The replication and coating of vaccinia DNA. *J Mol Biol* 1964 ; 10 : 452-74.

Kaiser J. Clinical research death prompts a review of gene therapy vector. *Science* 2007 ; 317 : 580.

Kaiser U, Auerbach B, and Oldenburg M. The neural cell adhesion molecule NCAM in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 1996 ; 20 : 389-95.

Kaplitt MG, Feigin A, Tang C, Fitzsimons HL, Mattis P et al. Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet* 2007 ; 369 : 2097-105.

Kasuya H et al. Selectivity of an oncolytic herpes simplex virus for cells expressing the DF3/MUC1 antigen. *Cancer Res* 2004 ; 64 : 2561-7.

Kelly Jnr TJ. Adenovirus DNA replication. *New York Plenum* 1984.

Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, et al. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat Med* 2000 ; 6 :879-85.

Kieny MP et al. Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature* 1984 ; 312 : 163-6.

Kim R, Emi M, Tanabe K, Arihiro, K. Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. *Cancer Res* 2006 ; 66 : 5527-36.

Kim SH, Carew JF, Kooby DA, Shields J, Entwistle C, Patel S, Shah JP, Fong Y. Combination gene therapy using multiple immunomodulatory genes transferred by a defective infectious single-cycle herpes virus in squamous cell cancer. *Cancer Gene Ther* 2000 ; 7 : 1279-85.

Kinzler KW and Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996 ; 87 : 159-70.

Kochanek S, Clemens PR, Mitani K, et al. A new adenoviral vector : replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length

- dystrophin and betagalactosidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 5731-6.
- Kochanek S, Schiendner G, Volpers C.** High-capacity « gutless » adenoviral vectors. *Curr Opin Mol Ther* 2001 ; 3 : 454-63.
- Kohler G, Milstein C.** Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975 ; 256 : 495-7.
- Kohn DB., Sadelain M, Glorioso JC.** Occurrence of leukemia following gene therapy of X-linked SCID. *Nat Rev Cancer* 2003 ; 3 : 477-88.
- Koizumi N, Kawabata K, Sakurai F, Watanabe Y, Hayakawa T, Mizuguchi H.** Modified adenoviral vectors ablated for coxsackievirus-adenovirus receptor, alphav integrin, and heparan sulfate binding reduce *in vivo* tissue transduction and toxicity. *Hum Gene Ther* 2006 ; 17 : 264-79.
- Kreppel F, Gackowski J, Schmidt E, Kochanek S.** Combined genetic and chemical capsid modifications enable flexible and efficient de- and retargeting of adenovirus vectors. *Mol Ther* 2005 ; 12 : 107-17.
- Krogsgaard M, Davis MM.** How T cells 'see' antigen. *Nat Immunol* 2005 ; 6 : 239-45.
- Kutubuddin M, Federoff HJ, Challita-Eid PM, et al.** Eradication of pre-established lymphoma using herpes simplex virus amplicon vectors. *Blood* 1999 ; 93 : 643-54.
- Kuriyama S, Sakamoto T, Kikukawa M, et al.** Expression of a retrovirally transduced gene under control of an internal housekeeping gene promoter does not persist due to methylation and is restored partially by 5-azacytidine treatment. *Gene Ther* 1998 ; 5 : 1299-305.
- Lachmann RH and Efstathiou S.** Use of herpes simplex virus type 1 for transgene expression within the nervous system. *Clin Sci (Lond)* 1999 ; 96 : 533-41. (a)
- Lachmann RH and Efstathiou S.** Gene transfer with herpes simplex vectors. *Curr Opin Mol Ther* 1999 ; 1 : 622-32. (b)
- Laker C, Meyer J, Schopen A, et al.** Host cis-mediated extinction of a retrovirus permissive for expression in embryonal stem cells during differentiation. *J Virol* 1998 ; 72 : 339-48.
- Lamers CH, Sleijfer S, Willemsen RA, et al.** Adoptive immunogene therapy of cancer with single chain antibody [scFv(Ig)] gene modified T lymphocytes. *J Biol Regul Homeost Agents* 2004 ; 18 : 134-40.
- Lanzavecchia A et Sallusto F.** From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation. *Curr Opin Immunol* 2000 ; 12(1) : 92-8.
- Le HT, Yu QC, Wilson JM, Croyle MA.** Utility of PEGylated recombinant adeno-associated viruses for gene transfer. *J Control Release* 2005 ; 108 : 161-77.

Lebedeva IV, Su ZZ, Chang Y, Kitada S, Reed JC, Fisher PB. The cancer growth suppressing gene mda-7 induces apoptosis selectively in human melanoma cells. *Oncogene* 2002 ; 21(5) :708-18.

Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 2004 ; 36 : 1-12.

Lee YB, Glover CP, Cosgrave AS, Bienemann A, Uney JB. Optimizing regulatable gene expression using adenoviral vectors. *Exp Physiol* 2005 ; 90 : 33-7.

Lee YS, Fim JH, Choi KJ, Kim H, Cho S, Cho BC, Yun CO. Enhanced antitumor effect of oncolytic adenovirus expressing interleukin-12 and B7-1 in an immunocompetent murine model. *Clin Cancer Res* 2006 ; 12 (19) : 5859-68.

Lenschow DJ, Walunas TL et Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996 ; 14 : 233-58.

Levine DP and Lerner AM. Case 44-1979: herpes simplex encephalitis. *N Engl J Med* 1980 ; 302 : 867-8.

Lewis R, Bagnall AM, Forbes C, et al. The clinical effectiveness of trastuzumab for breast cancer : a systematic review. *Health Technol Assess* 2006 ; 6 : 1-71.

Li Q, Kay MA, Finegold M, Stratford-Perricaudet LD, Woo SL. Assessment of recombinant adenoviral vectors for hepatic gene therapy. *Hum Gen Ther* 1993 ; 4 : 403-9.

Li X, Liu YH, Zhang YP, et al. Fas ligand delivery by a prostate-restricted replicative adenovirus enhances safety and antitumor efficacy. *Clin Cancer Res* 2007; 13 : 5463-73.

Li Y, et al. Loss of adenoviral receptor expression in human bladder cancer cells : a potential impact on the efficacy of gene therapy. *Cancer Res* 1999 ; 59 : 325-30.

Li Y, et al. A hepatocellular carcinoma-specific adenovirus variant, CV890, eliminates distant human liver tumors in combination with doxorubicin. *Cancer Res* 2001 ; 61 : 6428-36.

Ligibel JA, Winer EP. Trastuzumab/chemotherapy combinations in metastatic breast cancer. *Semin Oncol* 2002 ; 29 : 38-43.

Link CJ, Hellrung DJ, Seregina T, and Wang S. Eliciting hyperacute rejection as a tumor killing strategy. Herpes amplicon vector transfer of the alpha(1,3)galactosyltransferase gene. *Adv Exp Med Biol* 2000 ; 465 : 217-27.

Liu TC, Galanis E, Kirn D. Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress. *Nat Clin Pract Oncol* 2007 ; 4 : 101-17.

- Liu XY, Qiu SB, Zou WG, et al.** Effective gene virotherapy for complete eradication of tumor mediated by the combination of hTRAIL (TNFSF10) and plasminogenk5. *Mol Ther* 2005 ; 11 : 531-41.
- Liu Y, Ehtesham M, Samoto K, et al.** In situ adenoviral interleukin 12 gene transfer confers potent and long-lasting cytotoxic immunity in glioma. *Cancer Gene Ther* 2002 ; 9 : 9-15.
- Lizee G, Gonzales MI, Topalian SL.** Lentivirus vector-mediated expression of a tumor-associated epitopes by human antigen presenting cells. *Hum Gen Ther* 2004 ; 15 : 393-404.
- Lonberg N, Taylor LD, Harding FA, et al.** Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* 1994 ; 368 : 856-9.
- Loskog AS, Fransson ME, Totterman TT.** AdCD40L gene therapy counteracts T regulatory cells and cures aggressive tumors in an orthotopic bladder cancer model. *Clin Cancer Res* 2005 ; 11 : 8816-21.
- Lotem J and Sachs L.** Control of apoptosis in hematopoiesis and leukemia by cytokines, tumor suppressor and oncogenes. *Leukemia* 1996 ; 10 : 925-31.
- Lu W et al.** Intra-tumor injection of H101, a recombinant adenovirus, in combination with chemotherapy in patients with advanced cancers: a pilot phase II clinical trial. *World J Gastroenterol* 2004 ; 10 : 3634-8.
- Lukashev ME and Werb Z.** ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol* 1998 ; 8 : 437-41.
- Lundstrom K.** Semliki Forest virus vectors for gene therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2003 ; 3 :771-7.
- Luo J, Xia Q, Zhang R, Lv C, Zhang W, Wang Y, Cui Q, Liu L, Cai R, Qian C.** Treatment of cancer with a novel dual-targeted conditionnaly replicative adenovirus armed with *mda-7/IL-24* gene. *Clin Cancer Res* 2008 ; 14 (8) : 2450-7.
- Lynch, H.T., Fusaro, R.M., and Lynch, J.F.** Family history of cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1995 ; 768 : 12-29.
- Mackett M, Smith GL, Moss B.** General method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes. *J Virol* 1984 ; 49 : 857-64.
- Madan RA, Arlen PM, Mohebtash M, Hodge JW, Gulley JL.** Prostvax-VF : a vector-based vaccine targeting PSA in prostate cancer. *Expert Opin Invest Drugs* 2009 ; 18 : 1001-11.
- Madireddi MT, Su ZZ, Young CS, Goldstein NI, Fisher PB.** Mda-7, a novel melanoma

differentiation associated gene with promise for cancer gene therapy. *Adv Exp Med Biol* 2000 ; 465 : 239-61.

Magnusson MK, Hong SS, Henning P, Boulanger P, Lindholm L. Genetic retargeting of adenovirus vectors: functionality of targeting ligands and their influence on virus viability. *J Gene Med* 2002 ; 4 : 356-70.

Mahasreshti PJ, Kataram M, Wu H, et al. Ovarian cancer targeted adenoviral-mediated mda-7/IL-24 gene therapy. *Gynecol Oncol* 2006 ; 100 : 521-32.

Malerba M, et al. Replicating parvoviruses that target colon cancer cells. *J Virol* 2003 ; 77 : 6683-91.

Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, Larson PJ, Herzog RW, Arruda VR et al. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 2003 ; 101 : 2963-72.

Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJ, Ozelo, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 2006 ; 12 : 342-7.

Markowitz S, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995 ; 268 : 1336-8.

Marshall JL, Hoyer RJ, Toomey MA, et al. Phase I study in advanced cancer patients of a diversified prime-and-boost vaccination protocol using recombinant vaccinia virus and recombinant nonreplicating avipox virus to elicit anti-carcinoma embryonic antigen responses. *J Clin Oncol* 2000 ; 18 : 3964-73.

Martin P et al. A vector-based minigene vaccine approach results in strong induction of T-cell responses specific of hepatitis C virus. *Vaccine* 2008 ; 26 : 2471-81.

Martuza RL, Malick A, Markert JM, Ruffner KL, Coen DM. Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science* 1991 ; 252 : 854-6.

Mastrangelo MJ, Eisenlohr LC, Gomella L, Lattime EC. Poxvirus vectors: orphaned and underappreciated. *J Clin Invest* 2000 ; 105 : 1031-4.

Matzinger P. The danger model : a renewed sense of self. *Science* 2002 ; 296 : 301-5.

Mayr A, Stickl H, Muller HK, Danner K, and Singer H. [The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriol [B]* 1978 ; 167 : 375-90.

McCart J.A. et al. Complex interactions between the replicating oncolytic effect and the enzyme/prodrug effect of vaccinia-mediated tumor regression. *Gene Ther* 2000 ; 7 ; 1217-23.

Medema RH and Bos JL. The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Crit Rev Oncog* 1993 ; 4 : 615-61.

Merchinsky M, Garon CF, Moss B. Molecular cloning and sequence of the concatemer junction from vaccinia virus replicative DNA. Viral nuclease cleavage sites in cruciform structures. *J Mol Biol* 1988 ; 199 : 399-413.

Metcalf D, Burgess AW, Johnson GR, Nicola NA, Nice EC, DeLamarter J, et al. In vitro actions on hematopoietic cells of recombinant murine GM-CSF purified after production in *Escherichia coli* : comparison with purified native GM-CSF. *J Cell Physiol* 1986 ; 128 : 421-31.

Metchnikoff E. Études sur l'immunité : sur la destruction extracellulaire des bactéries dans l'organisme. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1895 ; 9 : 433-61.

Metharom P, Ellem KA, Schmidt C, Wei MQ. Lentiviral vector-mediated tyrosinase-related protein 2 gene transfer to dendritic cells for the therapy of melanoma. *Hum Gene Ther* 2001 ; 12 : 2203-13.

Meyer H, Sutter G, and Mayr A. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J Gen Virol* 1991 ; 72 (Pt 5) : 1031-8.

Mhashilkar AM, Schrock RD, Hindi M, Liao J, Sieger K, Kourouma F, et al. Melanoma differentiation associated gene-7 (mda-7): a novel antitumor gene for cancer gene therapy. *Mol Med* 2001 ; 7(4) : 271-82.

Mi J, Li ZY, Ni S, Steinwaerder D, Lieber A. Induced apoptosis supports spread of adenovirus vectors in tumors. *Hum Gene Ther* 2001 ; 12: 1343-52.

Milton GW. Tests of gastric function. A review. *Aust NZJ Surg* 1964 ; 33 : 283-8.

Miura TA, et al. Adenovirus E1A, not human papillomavirus E7, sensitizes tumor cells to lysis by macrophages through nitric oxide- and TNF- α -dependent mechanisms despite up-regulation of 70-kDa heat shock protein. *J Immunol* 2003 ; 170 : 4119-26.

Miyatake SI et al. Hepatoma-specific antitumor activity of an albumin enhancer/promoter regulated herpes simplex virus in vivo. *Gene Ther* 1999 ; 6 : 564-72. *Mol Ther* 2005 ; 11 : 66-79.

Mizuguchi H, Hayakawa T. Targeted adenovirus vectors. *Hum Gene Ther* 2004 ; 15 : 1034-44.

Molinier Frenkel V, Boulanger P. Les adénovirus : de la structure à la vectorisation de gènes et à la vaccinologie. I. Virologie des adénovirus et des adénovirus recombinant. *Virologie* 2003 ; 7 : 267-79.

Morgan RA, Dudley ME, Yu YYL, Zheng Z, Robbins PF, Theoret MR, Wunderlich JR, Hughes MS, Restifo NP, Rosenberg SA. High efficiency TCR gene transfer into

primary human lymphocytes affords avid recognition of melanoma tumor antigen glycoprotein 100 and does not alter the recognition of autologous melanoma antigens. *J Immunol* 2003 ; 171 : 3287-95.

Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. Chimeric human antibody molecules : mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984 ; 81 : 6851-5.

Moriuchi S et al. Enhanced tumor cell killing in the presence of ganciclovir by herpes simplex virus type 1 vector-directed coexpression of human tumor necrosis factor- α and herpes simplex virus thymidine kinase. *Cancer Res* 1998 ; 58 : 5731-7.

Moss B. Vaccinia virus: a tool for research and vaccine development. *Science* 1991 ; 252 : 1662-7.

Moss B. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 ; 93 : 11341-8.

Moss B, Smith GL, Mackett M. Use of vaccinia virus as an infectious molecular cloning and expression vector. *Gene Amplif Anal* 1983 ; 3 : 201-13.

Motley R, Kersey P, Lawrence C ; British Association of Dermatologists ; British Association of Plastic Surgeons. Multiprofessional guidelines for the management of the patient with primary cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Plast Surg* 2003 ; 56 : 85-91.

Mottershead DG, Alfthan K, Ojala K, Takkinen K, Oker-Blom C. Baculoviral display of functional scFv and synthetic IgG-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 ; 275 : 84-90.

Mulé JJ, Shu S, Schwarz SL, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases with LAK cells and recombinant interleukin-2. *Science* 1984 ; 225 : 1487-9.

Mullen JT, Tanabe KK. Viral oncolysis. *Oncologist* 2002 ; 7 : 106-19.

Myers JN, Mank-Seymour A, Zitvogel L, et al. Interleukin-12 gene therapy prevents establishment of SCCVII squamous cell carcinomas, inhibits tumor growth, and elicits long-term antitumor immunity in syngeneic C3H mice. *Laryngoscope* 1998 ; 108 : 261-268.

Nagata Y et al. Peptides derived from a wild-type murine protooncogene c-erbB-2/HER2/neu can induce CTL and tumor suppression in syngeneic hosts. *J Immunol* 1997; 159 : 1336-1343.

Nanda D, Vogels R, Havenga M, Avezaat CJ, Bout A, Smitt PS. Treatment of malignant gliomas with a replicating adenoviral vector expressing herpes simplex virus-thymidine kinase. *Cancer Res* 2001 ; 61 : 8743-50.

- Nasu Y, Bangma CH, Hull GW, et al.** Adenovirus-mediated interleukin-12 gene therapy for prostate cancer : suppression of orthotopic tumor growth and pre-established lung metastases in an orthotopic model. *Gene Ther* 1999 ; 6 : 338-49.
- Nestle FO et al.** Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998 ; 4 : 328-32.
- Nemunaitis J, Khuri F, Arseneau J, et al.** Selective replication and oncolysis en p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer : a phase II trial. *Cancer Res* 2000 ; 60 : 6359-66.
- Nettelbeck DM, Jerome V, Muller R.** A strategy for enhancing the transcriptional activity of weak cell type-specific promoters. *Gene Therapy* 1998 ; 5 : 1656-64.
- Newman W, Southam CM.** Virus treatment in advanced cancer : a pathological study of fifty-seven cases. *Cancer* 1954 ; 7 : 106-18.
- Ngo CV et al.** An in vivo function for the transforming Myc protein: elicitation of the angiogenic phenotype. *Cell Growth Differ* 2000 ; 11 : 201-10.
- Nguyen TH and Ho DQ.** Non melanoma skin cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2002 ; 3 : 193-203.
- Nishikawa T, Ramesh R, Munshi A, Chada S, Meyn RE.** Adenovirus-mediated mda-7 (IL-24) gene therapy suppresses angiogenesis and sensitizes NSCLC xenograft tumors to radiation. *Mol Ther* 2004 ; 9(6) : 818-28.
- Norman KL, Coffey MC, Hirasawa K, et al.** Reovirus oncolysis of human breast cancer. *Hum Gene Ther* 2002 ; 13 : 641-52.
- Nowell PC.** The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976 ; 194 : 23-8.
- Ogawara K, Rots MG, Kok RJ, Moorlag HE, Van Loenen AM, Meijer DK, Haisma HJ, Molema G.** A novel strategy to modify adenovirus tropism and enhance transgene delivery to activated vascular endothelial cells *in vitro* and *in vivo*. *Hum Gene Ther* 2004 ; 15 : 433-43.
- O'Malley BW, Cope KJ, Chen SH, Li D, Schwartz R, Woo SL.** Combination gene therapy for oral cancer in murine model. *Cancer Res* 1996 ; 56 : 1737-41.
- O'Reilly MS et al.** Angiostatin: a circulating endothelial cell inhibitor that suppresses angiogenesis and tumor growth. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994 ; 59 : 471-82.
- O'Reilly MS et al.** Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997 ; 88 : 277-85.
- O'Riordan CR, Lachapelle A, Delgado C, Parkes V, Wadsworth SC, Smith AE, Francis GE.** PEGylation of adenovirus with retention of infectivity and protection from

neutralizing antibody *in vitro* and *in vivo*. *Hum Gene Ther* 1999 ; 10 : 1349-58.

O'Shea CC *et al.* Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity. *Cancer Cell* 2004 ; 6 : 611-23.

Othman M, Labelle A, Mazzetti I, Elbatarny HS, Lillicrap D. Adenovirus induced thrombocytopenia: the role of von Willebrand factor and P-selectin in mediating accelerated platelet clearance. *Blood* 2007 ; 109 : 2832-9.

Palmowski MJ, Lopes L, Ikeda Y, Salio M, Cerundolo V, Collins MK. Intravenous injection of a lentiviral encoding NY-ESO-1 induces an effective CTL response. *J Immunol* 2004 ; 172 : 1582-7.

Parangi S *et al.* Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 ; 93 : 2002-7.

Pardoll DM. New strategies for enhancing the immunogenicity of tumors. *Curr Opin Immunol* 1993 ; 90 : 3539-43.

Pardoll DM. Cancer vaccines. *Nat Med* 1998 ; 4 (suppl) : 525-31.

Parker JN, Gillepsie GY, Love CE, *et al.* Engineered herpes simplex virus expressing IL-12 in the treatment of experimental murine brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 : 2208-13.

Parks RJ, Chen L, Anton M, *et al.* A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 13565-70.

Parrott MB, Adams KE, Mercier GT, Mok H, Campos SK, Barry MA. Metabolically biotinylated adenovirus for cell targeting, ligand screening, and vector purification. *Mol Ther* 2003 ; 8 : 688-700.

Paul S, Regulier E. Vecteurs viraux pour la thérapie génique du cancer. *Virologie* 2001 ; 5 : 53-69.

Paul S, Snary D, Hoebeke J, Allen D, *et al.* Targeted macrophage cytotoxicity using a nonreplicative live Vector expressing a tumor-specific single-chain variable region fragment. *Hum Gene Ther* 2000 ; 11 : 1417-28.

Pawelec, G. *et al.* Cells and cytokines in immunotherapy and gene therapy of cancer. *Crit Rev Oncog* 1999 ; 10 : 83-127.

Pei Z, Chu L, ZouW, *et al.* An oncolytic adenoviral vector of Smac increases antitumor activity of TRAIL against HCC in human cells and in mice. *Hepatology* 2004 ; 39 : 1371-81.

Pepper MS. Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997 ; 17 : 605-19.

- Perkus ME, Tartaglia J, and Paoletti E.** Poxvirus-based vaccine candidates for cancer, AIDS, and other infectious diseases. *J Leukoc Biol* 1995 ; 58 : 1-13.
- Philippe S, Sarkis C, Barkats M, Mammeri H, Ladroue C, Petit C, Mallet J, Serguera C.** Lentiviral vectors with a defective integrase allow efficient and sustained transgene expression *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 ; 103 : 17684-89.
- Phuangsab A, Lorence RM, Reichard KW, Peeples ME, Walter RJ.** Newcastle disease virus therapy of human tumor xenografts : antitumor effects of local or systemic administration. *Cancer Lett* 2001 ; 172 : 27-36.
- Piccart-Gebhart M, Procter M, Leyland-Jones B, et al.** Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005 ; 353 : 1659-72.
- Pietras RJ, Pegram MD, Finn RS, Maneval DA, Slamon DJ.** Remission of human breast cancer xenografts on therapy with humanized monoclonal antibody to HER-2 receptor and DNA-reactive drugs. *Oncogene* 1998 ; 17 : 2235-49.
- Pike-Overzet K, de RD, Weerkamp F, Baert MR, Verstegen MM, Brugman MH, et al.** Gene therapy: is IL2RG oncogenic in T-cell development? *Nature* 2006 ; 443 : E5-E7.
- Pitti, R.M. et al.** Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 1998 ; 396 : 699-703.
- Pogo BG, O'Shea M, Freimuth P.** Initiation and termination of vaccinia virus DNA replication. *Virology* 1981 ; 108 : 241-8.
- Porgador A, et al.** Anti-metastatic vaccination of tumor bearing mice with IL-2-gene-inserted tumor cells. *Int J Cancer* 1993 ; 53 : 471-7.
- Porgador A, Tzehoval E, Vadai E, Feldman M, Eisenbach L.** Immunotherapy via gene therapy: comparison of the effect of tumor cells transduced with the interleukin-2, interleukin-6, or interferon- γ genes. *J Immunol* 1993 ; 14 : 191-201.
- Puhlmann M et al.** Vaccinia as a vector for tumor-directed gene therapy: biodistribution of a thymidine kinase-deleted mutant. *Cancer Gene Ther* 2000 ; 7 : 66-73.
- Purow B, Staveley-O'Carroll K.** Targeting of vaccinia virus using biotin-avidin viral coating and biotinylated antibodies. *J Surg Res* 2005 ; 123 : 49-54.
- Qiao J, Doubrovin M, Sauter BV, et al.** Tumor-specific transcriptional targeting of suicide gene therapy. *Gene Ther* 2002 ; 9 : 168-75.
- Quantin B, Perricaudet LD, Tajbakhsh S, Mandel JL.** Adenovirus as an expression vector in muscle cells *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 2581-4.
- Queen C, Schneider WP, Selick HE, et al.** A humanized antibody that binds to to the interleukin-2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 10029-35.

- Qin L, Ding Y, Pahud DR, et al.** Promoter attenuation in gene therapy : interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha inhibit transgene expression. *Hum Gen Ther* 1997 ; 8 : 2019-29.
- Quinonez R, Sutton RE.** Lentiviral vectors for gene delivery into cells. *DNA Cell Biol* 2002 ; 21 : 937-51.
- Ramlau R, Westeel V, Papai Z, Riviere A, Madroszyk A, Koralewski P, Lacoste G, Acres B, Limacher JM, Quoix E.** Randomized phase IIb trial evaluating the therapeutic vaccine TG4010 (MVA-MUC1-IL2) as an adjunct to chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 2008 ; 26 (May 20 suppl; abstr 8023).
- Randrianarison-Jewtougoff V and Perricaudet M.** Recombinant adenoviruses as vaccines. *Biologicals* 1995 ; 23 : 145-57.
- Raper SE, Chirmule N, Lee FS, et al.** Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenovirale gene transfer. *Mol Genet Metab* 2003 ; 80 : 148-58.
- Raper SE, Yudkoff M, Chirmule N, et al.** A pilot study of *in vivo* liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency. *Hum Gen Ther* 2002 ; 13 : 163-75.
- Raty JK, Liimatainen T, Kaikkonen MU, Grohn O, Airene KJ, Yla-Herttuala S.** Non-invasive imaging in gene therapy. *Mol Ther* 2007 ; 15 : 1579-86.
- Raty JK, Airene KJ, Marttila AT, Marjomaki V, Hytonen VP, Lehtolainen P, et al.** Enhanced gene delivery by avidin-displaying baculovirus. *Mol Ther* 2004 ; 9 : 282-91.
- Ravi R et al.** Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* 2000 ; 14 : 34-44.
- Rein DT, Breidenbach M, Curiel DT.** Current developments in adenovirus-based cancer gene therapy. *Future Oncol* 2006 ; 2 : 137-43.
- Remmink AJ, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, et al.** The presence of persistan high-risk HPV genotypes in dysplasic cervical lesions is associated with progressive disease : natural history upto 36 months. *Int J Cancer* 1995 ; 61 : 306-11.
- Ribas A, Butterfield LH, Hu B, et al.** Generation of T-cell immunity to a murine melanoma using MART-1-engineered dendritic cells. *J Immunother* 2000 ; 23 : 59-66.
- Ries SJ et al.** Loss of p14ARF in tumor cells facilitates replication of the adenovirus mutant d11520 (ONYX-015). *Nature Med* 2000 ; 6 : 1128-33.

Rivera AA, et al. Combining high selectivity of replication with fiber chimerism for effective adenoviral oncolysis of CAR-negative melanoma cells. *Gene Ther* 2004 ; 11 : 1694-702.

Rivera AA, Wang M, Suzuki K, et al. Mode of transgene expression after fusion to early or late viral genes of a conditionally replicating adenovirus via an optimized internal ribosome entry site in vitro and in vivo. *Virology* 2004 ; 320 : 121-34.

Rodrigues T, Carrondo MJ, Alves PM, Cruz PE. Purification of retroviral vectors for clinical application: biological implications and technological challenges. *J Biotechnol* 2007 ; 127 : 520-41.

Rodriguez A, Regnault A, Kleijmeer M, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol* 1999 ; 1 : 362-8.

Roe T, Reynolds TC, Yu G, et al. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J* 1993 ; 12 : 2099-108.

Rogulski KR et al. In vivo antitumor activity of ONYX-015 is influenced by p53 status and is augmented by radiotherapy. *Cancer Res* 2000 ; 60 : 1193-6.

Rommel C and Hafen E. Ras--a versatile cellular switch. *Curr Opin Genet Dev* 1998 ; 8 : 412-8.

Rommelaere JC. Antineoplastic activity of parvovirus. *J Virol Meth* 1991 ; 33 : 233-51.

Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005 ; 353 : 1673-84.

Roop C, Hutchinson L, and Johnson DC. A mutant herpes simplex virus type 1 unable to express glycoprotein L cannot enter cells, and its particles lack glycoprotein H. *J Virol* 1993 ; 67 : 2285-97.

Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 1986 ; 233 : 1318-21.

Rosenberg SA. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* 1999 ; 10 : 281-7.

Rosenberg SA, Anderson WF, Blaese MR, Etting-Hausen SE, Hwu P, Karp SE. Initial proposal of clinical research project: immunization of cancer patients using autologous cancer cells modified by insertion of the gene for interleukin-2. *Hum Gen Ther* 1992 ; 3 : 75-90.

Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J*

Med 1985 ; 313 : 1485–1492.

Rothmann T, Hengstermann A, Whitaker NJ, Scheffner M, zur Hausen H. Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *J Virol* 1998 ; 72 : 9470-8.

Rueckert S, Ruehl I, Kahlert S, Konecny G, Untch M. A monoclonal antibody as an effective therapeutic agent in breast cancer : trastuzumab. *Expert opin Biol Ther* 2005 ; 5 : 853-66.

Russell WC. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* 2000 ; 81, 2573-604.

Sadeghi H, Hitt MM. Transcriptionally targeted adenovirus vectors. *Curr Gene Ther* 2005 ; 5 : 411-27.

Sadelain M, Riviere I, Brentjens R. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Nat Rev Cancer* 2003 ; 3(1) : 35-45.

Saeki T, Mhashilkar A, Chada S, Branch C, Roth JA, Ramesh R. Tumorsuppressive effects by adenovirus-mediated mda-7 gene transfer in non small cell lung cancer cell in vitro. *Gene Ther* 2000 ; 7(23) : 2051-7.

Saeki T, Mhashilkar A, Swanson X, Zou-Yang XH, Sieger K, Kawabe S, et al. Inhibition of human lung cancer growth following adenovirus-mediated mda-7 gene expression *in vivo*. *Oncogene* 2002 ; 21(29) : 4558-66.

Sandmair AM, Loimas S, Puranen P, Immonen A, Kossila M, Puranen M, et al. (2000) Thymidine kinase gene therapy for human malignant glioma, using replication-deficient retroviruses or adenoviruses. *Hum Gene Ther* 2000 ; 11 : 2197-205.

Santodonato L, Ferrantini M, Palombo F, Aurisicchio L, et al. Antitumor activity of recombinant adenoviral vector expressing murine IFN α in mice injected with metastatic IFN-resistant tumor cells. *Cancer Gen Ther* 2001 ; 8 : 63-72.

Sarov I et Joklik WK. Characterization of intermediates in the uncoating of vaccinia virus DNA. *Virology* 1972 ; 50 : 593-602.

Sauane M, Gopalkrishnan RV, Sarkar D, Su ZZ, Lebedeva IV, Dent P, et al. mda-7/IL-24 : novel cancer growth suppressing and apoptosis inducing cytokine. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003 ; 14(1) : 35-51.

Sauane M, Lebedeva IV, Su ZZ, Choo HT, Randolph A, Valerie K, et al. Melanoma differentiation associated gene-7/interleukin-24 promotes tumor cell-specific apoptosis through both secretory and nonsecretory pathways. *Cancer Res* 2004 ; 64(9) : 2988-93.

Savage HE, Rossen RD, Hersh EM, Freedman RS, Bowen JM, Plager C. Antibody development to viral and allogenic tumor cell-associated antigens in patients with malignant melanoma and ovarian carcinoma treated with lysters of virus-infected

tumor cells. *Cancer Res* 1986 ; 46 : 2127-33.

Schenk-Braat EA, van Mierlo MM, Wagemaker G, Bangma CH, Kaptein LC. An inventory of shedding data from clinical gene therapy trials. *J Gene Med* 2007 ; 9 : 910-21.

Schumacher TN. T-cell-receptor gene therapy. *Nat Rev Immunol* 2002 ; 2 : 512-9.

Sena-Esteves M, Saeki Y, Fraefel C, and Breakefield XO. HSV-1 amplicon vectors--simplicity and versatility. *Mol Ther* 2000 ; 2 : 9-15 (2000).

Seth P. Vector-mediated cancer gene therapy: an overview. *Cancer Biol Ther* 2005 ; 4 : 512-7.

Shay JW and Wright WE. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis* 2005 ; 26 :867-74.

Shayakhmetov DM, et al. Targeting of adenovirus vectors to tumor cells does not enable efficient transduction of breast cancer metastases. *Cancer Res* 2002 ; 62 : 1063-8.

Shchelkunov SN. Functional organization of variola major and vaccinia virus genomes. *Virus Genes* 1995 ; 10 : 53-71.

Shen Y and Nemunaitis J. Herpes simplex virus 1 (HSV-1) for cancer treatment. *Cancer Gene Ther* 2006 ; 13 : 975-92.

Shen Y, Nemunaitis J. Fighting cancer with vaccinia virus: teaching new tricks to an old dog. *Mol Ther* 2005 ; 11 : 180-95.

Shi J, Liu Y, Zheng Y, et al. Therapeutic expression of an anti-death receptor 5 single-chain fixed-variable region prevents tumor growth in mice. *Cancer Res* 2006 ; 66 : 11946-53.

Siegel JP, Puri RK. Interleukin-2 toxicity. *J Clin Oncol* 1991 ; 9 : 694-704.

Sinkovics JG, Horvath JC. Newcastle disease virus (NDV) : brief history of its oncolytic strains. *J Clin Virol* 2000 ; 16 : 1-15.

Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989 ; 244 : 707-12.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl Med* 2001 ; 344 : 783-92.

Smith GL. Vaccinia virus immune evasion. *Immunol Lett* 1999 ; 65, 55-62.

Smith GL et Vanderplasschen A. Extracellular enveloped vaccinia virus. Entry, egress, and evasion. *Adv Exp Med Biol* 1998 ; 440 : 395-414.

- Smith GL, de Carlos A, and Chan YS.** Vaccinia virus encodes a thymidylate kinase gene: sequence and transcriptional mapping. *Nucleic Acids Res* 1989 ; 17 : 7581-90.
- Sodroski J, Rosen C, Goh WC, Haseltine W.** A transcriptional activator protein encoded by the x-lor region of the human T-cell leukemia virus. *Science* 1985 ; 228 : 1430-4.
- Spear PG.** Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol* 2004 ; 6 : 401-10.
- Spear PG, Shieh MT, Herold BC, WuDunn D, and Koshy TI.** Heparan sulfate glycosaminoglycans as primary cell surface receptors for herpes simplex virus. *Adv Exp Med Biol* 1992 ; 313 : 341-53.
- Spencer DM.** Developments in suicide genes for preclinical and clinical applications. *Curr Opin Mol Ther* 2000 ; 2 : 433-40.
- Sporn MB.** The war on cancer. *Lancet* 1996 ; 347 : 1377-81.
- Stetler-Stevenson WG.** Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* 1999 ; 103 : 1237-41.
- Steven AC et al.** The making and breaking of symmetry in virus capsid assembly: glimpses of capsid biology from cryoelectron microscopy. *FASEB J* 1997 ; 11 : 733-42.
- Stewart AK, Lassam NJ, Quirt IC, Bailey DJ, Rotstein LE, Kraiden M et al.** Adenovector-mediated gene delivery of interleukin-2 in metastatic breast cancer and melanoma: results of a phase 1 clinical trial. *Gene Ther* 1999 ; 6 : 350-63.
- Stojdl DF, Lichty B, Knowles S, et al.** Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat Med* 2000 ; 6 : 821-5.
- Stojdl DF, Lichty BD, tenOever BR, et al.** VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* 2003 ; 4 : 263-75.
- Strasser A, Harris AW, Bath ML and Cory S.** Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* 1990 ; 348 : 331-3.
- Strobel I, Krumbholz M, Menke A, Hoffmann E, et al.** Efficient expression of a tumor-associated antigen MAGE-3 in human dendritic cells, using an avian influenza virus vector. *Hum Gen Ther* 2000 ; 11 : 2207-18.
- Su ZZ, Madireddi MT, Lin JJ, Young CS, Kitada S, Reed JC, et al.** The cancer growth suppressor gene mda-7 selectively induces apoptosis in human breast cancer cells and inhibits tumor growth in nude mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95(24) : 14400-5.
- Su Z, Lebedeva IV, Gopalkrishnan RV, Goldstein NI, Stein CA, Reed JC, et al.** A

combinatorial approach for selectively inducing programmed cell death in human pancreatic cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98(18) : 10332-7.

Swayne DE, Kapczynski D. Strategies and challenges for eliciting immunity against avian influenza virus in birds. *Immunol Rev* 2008 ; 225 : 314-31.

Szelechowski M, Saïb A. Une nouvelle arme contre le cancer : bilan sur les virus oncolytiques. *Virologie* 2005 ; 9 : 261-71.

Takeuchi Y, Pizzato M. Retrovirus vectors. *Adv Exp Med Biol* 2000 ; 465 : 23-35.

Tan AR and Swain SM. Review of flavopiridol, a cyclin-dependent kinase inhibitor, as breast cancer therapy. *Semin Oncol* 2002 ; 29 : 77-85.

Tan W, Dong Z, Wilkinson TA, Barbas CF, III, Chow SA. Human immunodeficiency virus type 1 incorporated with fusion proteins consisting of integrase and the designed polydactyl zinc finger protein E2C can bias integration of viral DNA into a predetermined chromosomal region in human cells. *J Virol* 2006 ; 80 : 1939-48.

Taqi AM, Abdurrahman MB, Yakubu AM, Fleming AF. Regression of Hodgkin's disease after measles. *Lancet* 1981 ; 1 : 1112.

Tartaglia J, et al. NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology* 1992 ; 188 : 217-32.

Tenenbaum L, Lehtonen E, Monahan PE. Evaluation of risks related to the use of adeno-associated virus-based vectors. *Curr Gene Ther* 2003 ; 3 : 545-65.

Tengelsen LA, Slabaugh MB, Bibler JK, et Hruby DE. Nucleotide sequence and molecular genetic analysis of the large subunit of ribonucleotide reductase encoded by vaccinia virus. *Virology* 1988 ; 164 : 121-31.

Terabe M, Berzofsky JA. Immunoregulatory T cells in tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 2004 ; 16 : 157-62.

Thome M et al. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 1997 ; 386 : 517-21.

Thornberry NA and Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998 ; 281 : 1312-6.

Tolba KA, Bowers WJ, Muller J, et al. Herpes simplex virus (HSV) amplicon-mediated codelivery of secondary lymphoid tissue chemokine and CD40L results in augmented antitumor activity. *Cancer Res* 2002 ; 62 : 6545-51.

Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983 ; 302 : 575-81.

Tong AW, Nemunaitis J, Su D, et al. Intratumoral injection of INGN 241, a nonreplicating adenovector expressing the melanoma-differentiation associated gene-7 (mda-7/IL24): biologic outcome in advanced cancer patients. *Mol Ther* 2005 ; 11 :

160-72.

Thrasher AJ, Gaspar HB, Baum C, Modlich U, Schambach A, Candotti F, Otsu M, et al. Gene therapy: X-SCID transgene leukaemogenicity. *Nature* 2006 ; 443 : E5-E6.

Trono D. Molecular biology and the development of AIDS therapeutics. *AIDS* 1996 ; 10 Suppl 3 : S53-9.

Trono D. Lentiviral vectors : turning a deadly foe into a therapeutic agent. *Gene Ther* 2000 ; 7 : 20-3.

Trudel S, Trachtenberg J, Toi A, Sweet J, Li ZH, Jewett M et al. A phase I trial of adenovector-mediated delivery of interleukin-2 (AdIL-2) in high-risk localized prostate cancer. *Cancer Gene Ther* 2003 ; 10 : 755-63.

Tsai SC, et al. Induction of antitumor immunity by interleukin-2 gene-transduced mouse mammary tumor cells versus transduced mammary stromal fibroblasts. *J Natl Cancer Inst* 1993 ; 85 : 546-53.

Tsuji H, Kawaguchi S, Wada T, et al. Adenovirus-mediated *in vivo* B7-1 gene transfer induces anti-tumor immunity against pre-established primary tumor and pulmonary metastases of rat osteosarcoma. *Cancer Gene Ther* 2002 ; 9 : 747-55.

Turunen MP, Puhakka HL, Koponen JK, Hiltunen MO, Rutanen J, et al. Peptide-retargeted adenovirus encoding a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 decreases restenosis after intravascular gene transfer. *Mol Ther* 2002 ; 6 : 306-12.

Urosevic M, Fujii K, Calmels B, Laine E, Kobert N, Acres B et al. Type I interferon innate response to adenoviral vector contributes to the regression of cutaneous lymphomas following adenovirus-mediated interferon- γ gene transfer. *J Clin Invest* 2007 ; 117 : 2834-46.

Urosevic M and Dummer R. Immunotherapy for nonmelanoma skin cancer: does it have a future? *Cancer* 2002 ; 94 : 477-485.

Valabrega G, Montemurro F, Aglietta M. Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspective in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Oncol* 2007 ; 18 : 977-84.

Van Custem E, Kang Y, Chung H, et al. Efficacy results from the ToGA trials: a phase III study of trastuzumab added to standard chemotherapy in first-line human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive advanced gastric cancer. *J Clin Oncol* 2009 ; 27 : 18S (abstract LBA4509).

Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 1997 ; 9 : 684-93.

Van Dillen IJ, Mulder NH, Vaalburg W, de Vries EF, Hospers GA. Influence of the

bystander effect on HSV-tk/GCV gene therapy. A review. *Curr Gene Ther* 2002 ; 2 : 307-22.

Vargas J Jr., Gusella GL, Najfeld V, Klotman ME, Cara A. Novel integrase-defective lentiviral episomal vectors for gene transfer. *Hum Gene Ther* 2004 ; 15 : 361-72.

Vaux DL, Cory S, and Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988 ; 335 : 440-2.

Verma IM and Weitzman MD. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem* 2005 ; 74 : 711-38.

Vini G Khurana and Fredric B Meyer. Translational paradigms in cerebrovascular gene transfer. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2003 ; 23 : 1251-62

Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002 ; 20 : 719-26.

Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. Head and neck cancer. *N Eng J Med* 1993 ; 328 : 184-94.

Volpers C, Thirion C, Biermann V, Hussmann S, Kewes H, Dunant P, et al. Antibody-mediated targeting of an adenovirus vector modified to contain a synthetic immunoglobulin g-binding domain in the capsid. *J Virol* 2003 ; 77 : 2093-104.

Volpert OV, Dameron KM and Bouck N. Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity. *Oncogene* 1997 ; 14 : 1495-502.

Wallack MK et al. Surgical adjuvant active specific immunotherapy for patients with stage III melanoma : the final analysis of data from a phase III, randomized, double-blind, multicenter vaccinia melanoma oncolysate trial. *J Am Coll Surg* 1998 ; 187 : 69-77.

Wan Y et al. Dendritic cells transduced with an adenoviral vector encoding a model tumor-associated antigen for tumor vaccination. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 1355–1363.

Wan Y et al. Enhanced immune response to the melanoma antigen gp100 using recombinant adenovirus-transduced dendritic cells. *Cell Immunol* 1999 ; 198 : 131-8.

Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995 ; 81 : 323-30.

Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV and Underwood PA. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J Biol Chem* 1996 ; 271 : 10079-86.

- Wickham TJ et al.** Targeted adenovirus-mediated gene delivery to T cells via CD3. *J Virol* 1997 ; 71 : 7663-9.
- Willis RA, Bowers WJ, Turner MJ, et al.** Dendritic cells transduced with HSV-1 amplicons expressing prostate-specific antigen generate antitumor immunity in mice. *Hum Gene Ther*, 2001 ; 12 : 1867-79.
- Wold WS, Tollefson AE, Hermiston TW.** E3 transcription unit of adenovirus. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995 ; 199 : 237-74.
- Wold WS, Doronin K, Toth K, Kuppuswamy M, Lichtenstein DL, Tollefson AE.** Immune responses to adenoviruses : viral evasion mechanisms and their implications for the clinic. *Curr Opin Immunol* 1999 ; 11 : 380-6.
- Wong RJ, Patel SG, Kim S, et al.** Cytokine gene transfer enhances herpes oncolytic therapy in murine squamous cell carcinoma. *Hum Gene Ther* 2001 ; 12 : 253-65.
- Woods NB, Bottero V, Schmidt M, Von KC, Verma IM.** Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma. *Nature* 2006 ; 440 : 1123.
- Work LM, Nicklin SA, Brain NJ, Dishart KL, Von Seggern DJ, Hallek M, Buning H, Baker AH.** Development of efficient viral vectors selective for vascular smooth muscle cells. *Mol Ther* 2004 ; 9 : 198-208.
- Wright WE, Pereira-Smith OM, and Shay JW.** Reversible cellular senescence : implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1989 ; 9 : 3088-92.
- Wyatt LS, Shors ST, Murphy BR, and Moss B.** Development of a replication-deficient recombinant vaccinia virus vaccine effective against parainfluenza virus 3 infection in an animal model. *Vaccine* 1996 ; 14 : 1451-8.
- Xia ZJ. et al.** [Phase III randomized clinical trial of intratumoral injection of E1B gene-deleted adenovirus (H101) combined with cisplatin-based chemotherapy in treating squamous cell cancer of head and neck or esophagus.]. *Ai Zheng* 2004 ; 23 : 1666-70.
- Yang L, Baltimore D.,** Long-term in vivo provision of antigen-specific T cell immunity by programming hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2005 ; 102 : 4518-23.
- Yang S et al.** Murine dendritic cells transfected with human GP100 elicit both antigen-specific CD8(+) and CD4(+) T-cell responses and are more effective than DNA vaccines at generating anti-tumor immunity. *Int J Cancer* 1999 ; 83 : 532-540.
- Yarden Y and Ullrich A.** Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 1988 ; 57 : 443-78.
- Ye Z, Hellstrom I, Hayden-Ledbetter M, et al.** Gene therapy for cancer using single-

chain Fv fragment specific for 4-1BB. *Nat Med* 2002 ; 8 : 343-8.

Yeon CH, Pegram MD. Anti-erb-2 antibody trastuzumab in the treatment of HER2-amplified breast cancer. *Invest New Drugs* 2005 ; 23 : 391-409.

Yi Y, Hahm SH, Lee KH. Retroviral gene therapy: safety issues and possible solutions. *Curr Gene Ther* 2005 ; 5 : 25-35.

Yotnda P, Chen DH, Chiu W, et al. Bilamellar cationic liposomes protect adenovectors from preexisting humoral immune response. *Mol Ther* 2002 ; 5 : 233-41.

Young CS. The structure and function of the adenovirus major late promoter. *Curr Top Microbiol Immunol* 2003 ; 272 : 213-49.

Yuan ZY, Zhang L, Li S, Qian XZ, Guan ZZ. [Safety of an E1B deleted adenovirus administered intratumorally to patients with cancer]. *Ai Zheng* 2003 ; 22 : 310-3.

Yu P, Lee Y, Liu W, et al. Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. *J Exp Med* 2005 ; 201 : 779-91.

Yu P, Rowley DA, Fu YX, Schreiber H. The role of stroma in immune recognition and destruction of well-established solid tumors. *Curr Opin Immunol* 2006 ; 18 : 226-31.

Zhang B, Bowerman NA, Salama JK, et al. Induced sensitization of tumor stroma leads to eradication of established cancer by T cells. *J Exp Med* 2007 ; 204 : 49-55.

Zhang JF, Hu C, Geng Y, et al. Treatment of a human breast cancer xenograft with an adenovirus vector containing an interferon gene results in rapid regression due to viral oncolysis and gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 4513-8.

Zhang R, Straus FH, De Groot LJ. Effective genetic therapy of established medullary thyroid carcinomas with murine interleukin-2 : dissemination and cytotoxicity studies in a rat tumor model. *Endocrinol* 1999 ; 140 : 2152-8.

Zhang W, Cai R, Luo JJ, et al. The oncolytic adenovirus targeting to TERT and RB pathway induced specific and potent anti-tumor efficacy *in vitro* and *in vivo* for hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2007 ; 6 : 1726-32.

Zhang W. Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther* 1999 ; 6 : 113-38.

Wang Y, Hu JK, Krol A, Li YP, Li CY, Yuan F. Systemic dissemination of viral vectors during intratumoral injection. *Mol Cancer Ther* 2003 ; 2 : 1233-42.

Zaiss AK, Muruve DA. Immune responses to adeno-associated virus vectors. *Curr Gene Ther* 2005 ; 5 : 323-31.

Zhao L, Gu J, Dong A, et al. Potent antitumor activity of oncolytic adenovirus expressing mda-7/IL-24 for colorectal cancer. *Hum Gene Ther* 2005 ; 16 : 845-58.

Zhao Y, Zheng Z, Robbins PF, Khong HT, Rosenberg SA, Morgan RA, et al. Primary human lymphocytes transduced with NY-ESO-1 antigen-specific TCR genes recognize and kill diverse human tumor cell lines. *J Immunol* 2005 ; 174 : 4415-23.

Annexe 1 : Caractéristiques et résultats des patients de l'étude de Dummer R et al. 2008

Cohort	Dose (vp)	Schedule	Patient ID	Sex	Age	Tumor type	Stage at baseline	No. of injections	Response* (injected lesions)	Response (non-injected lesions)	Comments
1 (n = 4)	3 × 10 ⁸	Every 3 weeks	1	F	48	Invasive ductal breast cancer	IV	2	PD		
			2	F	55	Head and neck cancer*	IV	1	NE		*Primary tumor discovered after metastases
			3	M	56	Adenocarcinoma of the colon	IV	3	PD		
			4	M	86	Melanoma	IV	2	PD		*Primary tumor unknown
2 (n = 3)	3 × 10 ⁹	Every 3 weeks	5	F	30	Melanoma	IV	3	PD		
			6	F	35	Primitive neuroectodermal tumor of the kidney	IV	2	PD		
			7	M	64	Melanoma	III	6	PD		
3 (n = 3)	3 × 10 ¹⁰	Every 3 weeks	8	M	54	Mesothelioma	III	2	PD		
			9	F	69	Melanoma	IV	2	PD		
			10	F	71	Adenocarcinoma of the gall bladder	IV	2	PD		
4 (n = 4)	8 × 10 ¹⁰	Every 3 weeks	11	M	67	Melanoma	III	2	PD		
			12	M	62	Melanoma*	IV	4	SD		*Primary tumor unknown
			13	F	49	Melanoma	IV	2	PD		
			14	M	78	Cholangiocarcinoma	IV	6	SD		
5 (n = 6)	3 × 10 ¹¹	Every 3 weeks	15	M	59	Melanoma	III	4	PD		
			16	F	28	Melanoma	IV	6	PD		
			17	F	59	Melanoma	III	7	PR, SD	SD*	Two out of three lesions were treated: cervical right (Ø 2.5 cm), axillary right (Ø 2.9 cm); *observed on noninjected lesion in right supraclavicular region
			18	M	53	Retroperitoneal liposarcoma	IV	4	PD		
			19	M	68	Mesothelioma	III	4	PD		
			21	M	48	Melanoma	IV	9	SD	SD*	*Observed on liver and adrenal metastases
6 (n = 3)	3 × 10 ¹¹	Every 2 weeks	22	M	22	Melanoma*	IV	20**	CR, CR		Two lesions both treated: inguinal right (Ø 1.8 cm), cervical right (Ø 2.4 cm) *primary tumor unknown; **patient received >12 injections
			23	M	60	Squamous cell carcinoma of the skin*	IV	3	1 CR, 1 SD, 3 PD		*Broder's grade 2 five lesions out of six were treated: three lesions preauricular (Ø 2.2 cm; Ø 2 cm; Ø 1 cm) supraauricular left (Ø 2 cm), chin (Ø 0.6 cm)
			24	F	59	Melanoma	III	4	PD		
			25	F	34	Melanoma	IV	10	PR		*Primary tumor unknown One out of three lesions were treated: leg right (Ø 3.1 cm)
7 (n = 6)	3 × 10 ¹¹	Every 2 weeks + dacarbazine	26	F	79	Melanoma	III	10	PD		
			27	M	69	Melanoma	III	2	PD		
			28	M	76	Melanoma	III	2	PD		
			29	F	69	Melanoma	III	12	CR, PR	SD	Two out of three lesions were treated: inguinal left proximal (Ø 1.8 cm) and distal (Ø 1.7 cm)
			30	M	44	Melanoma	III	12	SD	SD	
8 (n = 6)	3 × 10 ¹¹	Every week	31	M	65	Melanoma	IV	7	PD		
			32	F	51	Melanoma	IV	6	PD		
			33	F	31	Melanoma	IV	6	CR, SD		Two out of five lesions were treated: lower arm subcubital right (Ø 1 cm) and supracubital (Ø 1 cm)
			35	M	54	Melanoma	IV	3	NE		*Primary tumor unknown
			36	M	83	Melanoma	IV	6	PD		
			37	M	48	Melanoma	IV	7	PD		

Abbreviations: F, female; M, male; n, number of patients; NE, not evaluable for clinical response assessment; vp, viral particles.

*Complete Response (CR) is defined as the absence of detectable residual disease maintained for a minimum of 4 weeks. Partial Response (PR) is defined as a ≥50% decrease in the size of pre-existing lesions in the absence of disease progression and newly appearing lesions, maintained for a minimum of 4 weeks. Stable Disease (SD) is defined as any change that did not meet the criteria for CR, PR, or PD. Progressive Disease (PD) is defined as an increase of >25% in the pre-existing lesions or the appearance of new lesions.

Annexe 2 : Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique
ADNsb/db : ADN simple brin/double brin
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ARNsb/db : ARN simple brin/double brin
AAV : adenovirus associated virus
ATP : adénosine triphosphate
Ac : anticorps
Ad : adénovirus
Ag : antigène
CAR : coxsackie adenovirus receptor
CPA : cellules présentatrice d'antigènes
BAGE : antigène B du mélanome
BCL : protéine anti-apoptotique («*B-cell lymphoma protein*»)
BCR : récepteur des lymphocytes B
CD suivi d'un chiffre : marqueur de différenciation (« Cluster of différenciation »)
CD : cellule dendritique
CEA : antigène carcinoembryogénique
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CMV : cytomégalovirus.
CTL : lymphocyte T cytotoxique
DMSO : diméthylsulfoxyde
EBV : virus d'Epstein Barr
EDTA : éthylène diamine tétraacétate de sodium
EGF : epithelial growth factor/facteur de croissance epitheliale
FGF : facteur de croissance fibroblastique
FITC : isothiocyanate de fluorescéine
FLT3-L : ligand de la fms-like tyrosine kinase 3
GAGE : antigène G du mélanome
GM-CSF : facteur de croissance des granulocytes-macrophages
gp100: glycoprotéine de 100 kDa
GFP : green fluorescent protein
GPI : glycoposphatidylinositol
GTP: guanosine triphosphate
HER-2/neu : récepteur oncogène à l'EGF
HLA : antigènes des leucocytes Humain (« Human Leucocyte Antigens »).
HPV : papilloma virus humain
HSV : virus *Herpes simplex*
hTERT : hTERT : human reverse transcriptase telomerase/transcriptase reverse de la telomerase humaines
i.d. : intradermique
i.m. : intramusculaire
i.n. : intranodulaire
i.p.: intrapéritonéal
i.t. : intratumoral
i.v. : intraveineux
IFN : interféron

IL : interleukine
IP3 : inositol 1,4,5 triphosphat
kDa : kiloDalton
kpb : kilo paire de base
LPD : complexe lipide-protamine-ADN.
LPS : lipopolysaccharides
LT(c/h) : lymphocyte T (cytotoxique ou helper)
LV : lentivirus
MAGE : "*melanoma-associated antigen*", antigène associé au mélanome
MAPK : MAP kinase
MART1/MelanA: "*melanoma antigen recognized by T cells / melanoma antigen A*", antigène A du mélanome
MEC : matrice extracellulaire
MOI : multiplicity of infection/taux de particules virales par cellule
MUC1 : mucine 1
MVA : modified vaccinia virus Ankara
NDV : Newcastle disease virus/virus de la maladie de Newcastle
NK : cellules « Natural Killer »
ORF : cadre ouvert de lecture
PBMC : cellules mononucléées du sang périphérique
PBS : tampon phosphate salin pH = 7,4
PCR : polymerase chain reaction/reaction polymérase en chaîne
PEG : polyéthylène glycol
PEI : polyéthylèneimine
PET : PBS avec 0,02% d'EDTA et 2,5 µg/ml de trypsine
PFA : paraformaldéhyde
PI3K : phospho-inositol-3 kinase
pRB : retinoblastoma protein/proteine du retinoblastome
PSA : antigène membranaire spécifique de la prostate
SAB : sérum albumine bovine
SmaRT : épissage en trans médié par le spliceosome
TAA : antigène associé aux tumeurs
TAP : transporteur associé à la présentation antigénique
TCR : récepteur des lymphocytes T
TF : facteur de transcription
TGF-β : facteur de croissance transformant β
Th : lymphocytes T auxiliaire (« helper »)
TIL : lymphocytes T infiltrés
TK : thymidine kinase
TNF : facteur de nécrose des tumeurs
TNFR : TNF receptor/recepteur du TNF
TRP : enzyme du mélanosome (DOPA chrome tautomérase, « *tyrosinase-related protein* »)
VEGF : vascular growth endothelial factor/facteur de croissance endothéliale vasculaire
VIH : virus d'immunodéficience humaine
VacV : virus de la vaccine
VSV : vesicular stomatitis virus/virus de la stomatite vésiculeuse

Toulouse, 2010

NOM : YOUALA

Prénom : Myriam

TITRE : Utilisation des vecteurs viraux dans l'immunothérapie antitumorale

RESUME : Les virus sont des outils très intéressants pour délivrer du matériel génétique dans les cellules qu'ils infectent ; c'est pourquoi la thérapie génique les a vite adoptés pour de nombreuses applications, notamment dans la lutte contre les cancers. L'immunothérapie consiste en la stimulation du système immunitaire pour lutter contre une maladie. Différentes stratégies utilisant des vecteurs viraux ont été entreprises : induire une réponse immunitaire anticancéreuse spécifique, moduler la réponse immunitaire, ou encore associer l'immunothérapie à d'autres thérapeutiques comme la virothérapie ou la thérapie monoclonale. L'utilisation des vecteurs viraux dans l'immunothérapie antitumorale est un domaine de recherche encore au stade des essais cliniques animaux et humains. L'objet de cette thèse est de faire un état des lieux sur l'utilisation des vecteurs viraux dans les stratégies d'immunothérapie antitumorale.

MOTS-CLES : vecteurs viraux, immunothérapie antitumorale, réponse immunitaire, induction, modulation, association.

ENGLISH TITLE : Viral vectors in cancer immunotherapy

ABSTRACT : Viruses represent an attractive tool for gene delivering in infected cells ; this is why they are investigated by cancer gene therapy. The immunotherapy consists of an immune system stimulation. Different immunogene therapy strategies have been undertaken using viral vectors : to induce anti-tumor immune responses, to modulate immune responses. Immunotherapy can be associated with virotherapy or monoclonal therapy. The use of viral vectors in antitumoral immunotherapy is still in human and animal clinical trial stage. This thesis describes the use of viral vectors in antitumoral immunotherapy.

KEYWORDS : viral vectors, antitumoral immunotherapy, immune response, induction, modulation , association.