

UNIVERSITE PARIS DESCARTES
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

Ecole Doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie, Environnement (MTCE)

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Toxicologie moléculaire, Pharmacologie, Biologie cellulaire et moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

Walid TOUATI

Le 27 novembre 2013

Sensibilisation de cellules tumorales au cyclophosphamide par transfert de gène :
de l'*in vitro* à l'*in vivo*

JURY

Mr le Docteur Pierre Cordelier	Rapporteur
Mr le Docteur Patrick Maurel	Rapporteur
Mr le Professeur Eric Tartour	Examineur
Mr le Professeur François Lemoine	Examineur
Mme le Professeur Nathalie Cartier	Président du Jury
Mme le Docteur Isabelle de Waziers	Directeur de Thèse

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	3
REMERCIEMENTS.....	6
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES.....	8
LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES.....	12
PRÉAMBULE.....	16
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	18
PARTIE I : LA THÉRAPIE GÉNIQUE DU CANCER	
CHAPITRE I : THÉRAPIE GÉNIQUE ET CANCER	24
I STRATÉGIES ANTITUMORALES	28
I.1 GÈNES SUPPESSEURS DE TUMEUR	28
I.2 THÉRAPIE GÉNIQUE ET IMMUNOTHÉRAPIE ANTITUMORALE	30
II LES VECTEURS DE TRANSFERT DE GÈNE.....	32
II.1 LES VECTEURS VIRAUX	33
II.1.1 LES RÉTROVIRUS.....	34
II.1.2 LES LENTIVIRUS.....	35
II.1.3 LES ADÉNOVIRUS.....	37
II.1.4 LES : VIRUS ASSOCIÉS À L'ADÉNOVIRUS	38
II.2 LES VECTEURS NON VIRAUX	39
III LA GENE DIRECTED ENZYME PRODRUG THERAPY (GDEPT)	40
III.1 PRINCIPE	40
III.2 LES DIFFÉRENTES COMBINAISONS GÈNE SUICIDE UTILISÉES.....	41
III.2.1 THYMIDINE KINASE - GANCICLOVIR.....	41
III.2.2 CYTOSINE DÉSAMINASE – 5-FLUOROCYTOSINE.....	43
III.2.3 DÉSOXYCYTIDINE KINASE - GEMCITABINE	45
III.2.4 NITRORÉDUCTASE – CB1954.....	48
III.2.5 LES CYTOCHROMES P450	50
III.2.5.1 CYTOCHROME 2B/CYCLOPHOSPAHMIDE	55
III.2.5.2 CYTOCHROME P450 2B6	57
III.2.5.2.1 CONSTRUCTION D'UN MUTANT CYP2B6.....	59
III.2.5.3 CYTOCHROME 2B/IFOSFAMIDE	60
III.2.5.4 AUTRES CYTOCHROMES P450	61
OBJECTIFS DE LA THÈSE	64
PARTIE II : AMÉLIORATION D'UNE STRATÉGIE GDEPT	
CHAPITRE II : OPTIMISATION D'UN GÈNE SUICIDE	66

PRÉSENTATION DU TRAVAIL DE THÈSE.....	66
ARTICLE EN COURS DE SOUMISSION ET BREVET.....	68
DISCUSSION	69
CONCLUSION – PERSPECTIVES	78

PARTIE III : ANNEXES

ANNEXE I : BREVET.....	85
ANNEXE II : POLYMORPHISME DU CYP2B6.....	86
ANNEXE III : L'EFFET BYSTANDER DANS LA GDEPT	88
I L'EFFET BYSTANDER	88
I.1 EFFET BYSTANDER PASSANT PAR LA DIFFUSION PASSIVE.....	88
I.1.2 EFFET BYSTANDER PASSANT PAR LES JONCTIONS COMMUNICANTES.....	89
PRÉSENTATION DU TRAVAIL	92
RÉSULTATS	96
DISCUSSION	99
ANNEXE IV : CIBLAGE DES CELLULES	104
I DÉVELOPPEMENT D'UNE STRATÉGIE DE RÉGULATION DE L'EXPRESSION DU TRANSGÈNE À L'AIDE DE SÉQUENCES CIBLES DE MICROARN	107
I.1 LES MICROARN	107
I.2 LES MICROARN COMME OUTIL DE RÉGULATION DE L'EXPRESSION DU TRANSGÈNE.....	108
PRÉSENTATION DU TRAVAIL	110
RÉSULTATS	113
DISCUSSION	114
ANNEXE V: LES CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES COMME VECTEUR DE TRANSFERT	117
I LES CELLULES SOUCHES	117
I.1 DÉFINITION	117
I.2 LES CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES	119
I.3 L'UTILISATION DE CELLULES SOUCHES EN THÉRAPIE.....	121
I.4 L'UTILISATION DE CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES EN THÉRAPIE ANTITUMORALE	121

PRÉSENTATION DU TRAVAIL	123
RÉSULTATS	124
DISCUSSION	125
ANNEXE VI : LISTE DES ACTIVITÉS ANNEXES À LA THÈSE.....	128
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	129

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

4-OH CPA : 4 hydroxy-cyclophosphamide

4-OOH-CPA : 4 hydroperoxy-cyclophosphamide

5-FC : 5 – Fluorocytosine

5-FU : 5 - Fluorouracile

A

AAV : Adeno-Associated Virus (Virus associé à l'adénovirus)

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AGA : Acide Alpha-Glycyrrhétinique

Ago : Argonautes (protéines)

ALDH : Aldéhyde Déshydrogénase

ARN : Acide Ribonucléique

ARSA : Arylsulfatase A lysosomale

B

BRCA 1-2 : BReast CAncer protein 1-2

BSA : Bovine Sérum Albumine

C

CAR : Coxsackie and Adenovirus Receptor

CD : Cytosine Désaminase

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cyclophosphamide

CYP : Cytochrome P450

CYP2B6TM-RED : Cytochrome P450 2B6 triple mutant – NADPH cytochrome P450

Réductase (gène de fusion)

Cx : Connexine

D

DAPI : 4',6'-diamidino-2 phénylindole

DCK : DésoxyCytidine Kinase

F

FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide

FDA : Food and Drug Administration

FMN : Flavine Mononucléotide

FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching

G

GCV : Ganciclovir

GDEPT : Gene Directed Enzyme Prodrug Therapy

GFP : Green Fluorescent Protein (Protéine fluorescente verte)

GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

GST : Glutathion S Transférase

H

HEK : Human Embryonic Kidney (cellule embryonnaire humaine de rein)

HPV: Human PapillomaVirus (Virus Humain du *Papilloma*)

HSV-tk : Herpes Simplex Virus - Thymidine Kinase

I

IC50 : Inhibition concentration 50 (concentration pour laquelle l'inhibition est de 50%)

K

Kb : Kilobase

K_m : Constante de Michaelis

L

Luc : Luciférase

LV : Lentivirus

LT rég : Lymphocyte T régulateur

M

miARN : microARN (acide ribonucléique)

mir : microARN (acide ribonucléique)

MSC : Mesenchymal Stem Cell (Cellule Souche Mésoenchymateuse)

MOI : Multiplicity Of Infection (nombre de particules virales par cellules)

N

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate, forme réduite

O

ORL : Oto-Rhino-Laryngologie

P

PAP : Phosphatase Acide Prostatique

PEI : Polyéthylèneimine

PEG : Polyéthylèneglycol

PFA : Paraformaldéhyde

PCR : Polymérase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaine)

Q

qPCR : quantitative PCR (Réaction de polymérisation en chaine quantitative)

R

RED : NADPH-Cytochrome P450 réductase

RISC : RNA-induced silencing complex

S

SCID : Severe Combined ImmunoDeficiency

T

TBP : TATA Binding Protein (Protéine de liaison à la boîte TATA)

TRBP : The human immunodeficiency virus transactivating response RNA-Binding Protein

TRITC : Tetraméthyl Rhodamine Iso Thio Cyanate

U

UGT : UDP – Glycosyl Transférase

UMK : Uridine Monophosphate Kinase

UTR : UnTranslated Region (région non traduite)

V

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

V_{max} : Vitesse maximale (d'une réaction enzymatique)

VSV-G : Vesicular Stomatitis Virus – Glycoprotein

W

WT : wild-type (sauvage)

Z

ZO1 : Zonula Occludens 1

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

TABLEAUX

Tableau 1 : Propriétés des principaux vecteurs viraux utilisés en thérapie génique

Tableau 2 : Résumé des principaux essais cliniques réalisés utilisant HSV-tk / Ganciclovir

Tableau 3 : Constantes cinétiques du métabolisme du cyclophosphamide par différents cytochromes P450

Tableau 4 : Modèles de souris développant des tumeurs pulmonaires

Tableau 5 : Valeurs de Ct (après amplification par PCR) des miARN 142, 26a et let-7a dans 9 lignées tumorales pulmonaires humaines, du tissu sain, poumon sain, foie sain et cellules sanguines

Tableau 6 : Nature histologique des biopsies tumorales pulmonaires

Tableau 7 : Concentrations en CPA et 4OH-CPA retrouvées dans des milieux de cultures après traitement de cellules A549 CYP2B6TM-RED avec du CPA ou du 4-OOH-CPA durant 48 heures

Tableau 8 : Génotypage du CYP2B6 dans une lignée de lymphome de Burkitt

FIGURES

Figure 1 : Schéma représentant la pression de sélection clonale des tumeurs

Figure 2 : Principe générale de la thérapie génique

Figure 3 : Protocole de l'expérience de Lederberg et Tatum sur le transfert de matériel génétique entre bactéries.

Figure 4 : Principe et protocole de la thérapie génique des enfants atteints de SCID-X

Figure 5 : Répartition des essais cliniques de thérapie génique en fonction des pathologies traitées

Figure 6 : Flacon de Gendicine : première thérapie anticancéreuse commercialisée au monde

Figure 7 : Schéma du mécanisme d'action du Sipuleucel-T (Provenge[®])

Figure 8 : Vecteurs viraux et non viraux utilisés dans des protocoles de thérapie génique

Figure 9 : Représentation schématique du génome de vecteurs lentiviraux

Figure 10 : Représentation schématique de la structure d'un vecteur lentiviral pseudotypé avec des glycoprotéines d'enveloppe VSV-G.

Figure 11 : Interactions et internalisation d'un vecteur adénoviral avec sa cellule cible

Figure 12 : Représentation schématique d'un adénovirus

Figure 13 : Génome de l'AAV (parental strain) et de vecteurs AAV (vector)

Figure 14 : Structure d'une sous-unité monomérique de l'AAV (pdb 11p3)

Figure 15 : Principe de la Gene Directed Enzyme Prodrug Therapy (GDEPT) ou thérapie gène suicide

Figure 16 : Métabolisme d'activation du ganciclovir

Figure 17 : Métabolisme de la 5-Fluorcytosine

Figure 18 : Voies métaboliques de la gemcitabine

Figure 19 : Métabolisme du CB 1954

Figure 20 : Représentation schématique d'un cytochrome P450 associé à la NADPH cytochrome P450 réductase, ancrés dans la membrane du réticulum endoplasmique

Figure 21 : Métabolisme des xénobiotiques

Figure 22 : Représentation schématique des feuillets et hélices d'un CYP

Figure 23 : Cycle catalytique du Cytochrome P450

Figure 24 : Structures cristallisées des principaux CYP

Figure 25 : Métabolisme et voie d'activation du Cyclophosphamide

Figure 26 : Représentation schématique de l'hème du CYP en présence de CPI ou de CPA dans le site actif

Figure 27 : Structure cristallographique du CYP2B6 sauvage (wild type, wt) (A) et du CYP2B6 double mutant (I114V, V477W) (B)

Figure 28 : Représentation schématique du canal d'entrée du substrat dans le CYP2B6 (A) et du site actif du CYP2B6 (B)

Figure 29 : Graphe représentant l'activité CPA hydroxylase de microsomes de levures exprimant le CYP2B6TM triple mutant (courbe rouge) ou le CYP2B6^{wt} wild-type (courbe noire)

Figure 30 : Expression du CYP2B6TM-RED dans des cellules A253 et cytotoxicité du CPA

Figure 31 : Evolution du volume tumoral de souris ayant des tumeurs exprimant le CYP2B6^{wt}-RED ou CYP2B6TM-RED traitées au CPA

Figure 32 : Protocole et plan des expériences de traitement au CPA de souris immunodéprimées (nude)

Figure 33 : Protocole et plan des expériences d'injection intratumorale du vecteur recombinant lentiviral CYP2B6TM-RED

Figure 34 : Effet *bystander* sur des cellules non transduites : exemple de HSV-tk

Figure 35 : Expression relative des connexines 26, 32, 43 dans des biopsies tumorales pulmonaires humaines

Figure 36 : Images d'immunofluorescence de lignées tumorale pulmonaire humaine A549 et d'une coupe de tumeur pulmonaire humaine

Figure 37 : Résultats Gap-FRAP et Mortalité cellulaire après traitement au CPA de cellules A549 CYP2B6TM-RED en présence ou non d'AGA (inhibiteur de connexines)

Figure 38 : Représentation schématique de la production de vecteurs pseudotypés et l'interaction avec leurs cibles

Figure 39 : Biogenèse des microARN

Figure 40 : Stratégie d'inhibition de l'expression d'un transgène à l'aide de séquences cibles de miARN

Figure 41 : Images d'épifluorescence des cellules A549 après transfection par PGL3-GFP et PGL3-GFP-mir142T avec ou sans pmir142

Figure 42 : Expression relative par rapport à une biopsie référence du miARN 142 dans des biopsies de tumeurs pulmonaires humaines et dans des tissus sains

Figure 43 : Stratégies de prélèvement d'isolation et d'applications cliniques des cellules souches mésenchymateuse

Figure 44 : Protocole de prélèvement et d'isolation de cellules souches mésenchymateuses chez un patient à partir de tissu adipeux

Figure 45 : Expression relative en ARNm CYP2B10, CYP2B6 et RED dans des cellules MSC NI (non infectées) et MSC CYP2B6TM-RED

Figure 46 : Viabilité cellulaire de cellules MSC CYP2B6TM-RED traitées au CPA durant 3 jours

Figure 47 : Viabilité cellulaire de mélange cellulaire TC1 et MSC CYP2B6TM-RED

Figure 48 : Images microscopiques de mélanges de cellules TC1 et MSC CYP2B6TM-RED traitées au CPA (1 mM)

PRÉAMBULE

Les traitements contre le cancer ont fait l'objet de grandes avancées au cours des vingt dernières années. D'une thérapeutique globale touchant l'ensemble des organes, avec la chimiothérapie systémique et/ou la radiothérapie, nous sommes passés à des traitements ciblés qui améliorent l'efficacité et diminuent la toxicité. Cependant, du fait d'effets secondaires encore mal maîtrisés et de l'apparition de résistances à ces traitements ciblés, il semble essentiel de développer de nouvelles stratégies antitumorales afin d'améliorer le pronostic et la qualité de vie des patients.

Parmi les thérapies en développement, l'utilisation de gènes suicides semble être prometteuse. Elle se base sur l'expression dans la tumeur d'une enzyme métabolisant une prodrogue anticancéreuse en métabolites cytotoxiques. Les premiers essais précliniques démontrent l'efficacité de cette stratégie dans le traitement des tumeurs et ont conduit à la mise en place d'essais cliniques.

Malheureusement, les premiers résultats ont été relativement décevants notamment du fait :

- 1) Du faible niveau d'expression du transgène dans les tumeurs,
- 2) D'une activité souvent modérée du transgène à métaboliser la prodrogue en métabolites cytotoxiques
- 3) D'une faible diffusion de ces métabolites d'une cellule tumorale à l'autre.

Pour toutes ces raisons, certains se sont posés la question du réel intérêt de cette technique en thérapeutique anticancéreuse.

L'amélioration des techniques de gène suicide est donc primordiale avant une utilisation potentielle en clinique.

L'objectif de ce travail s'inscrit dans cette nécessité d'améliorer la technique du gène suicide. Pour ce faire nous avons construit un nouveau gène suicide « optimisé » : le cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) humain muté en fusion avec la NADPH CYP réductase permettant, par rapport au CYP2B6 sauvage, une métabolisation accrue d'une prodrogue, le Cyclophosphamide (CPA) en métabolites cytotoxiques. L'expression de ce gène *in vitro* et *in vivo* a permis de mettre en évidence des résultats particulièrement encourageants, qui pourraient conduire à terme à une future application clinique.

INTRODUCTION GENERALE

Malgré une incidence en hausse, 370 000 nouveaux cas en 2011, on observe, ces dernières années, une diminution de la mortalité par cancer et une augmentation de l'espérance de vie après un cancer (Institut de veille sanitaire, InVS). La survie relative à 5 ans varie selon le type de cancer. Par exemple, sur les patients diagnostiqués en 2005, 38% guériront de leur cancer et 42% ont une survie relative à 5 ans supérieure ou égale à 80% (*La situation du cancer en France en 2010*, INCa). Cependant, le cancer reste la première cause de mortalité chez l'homme et la deuxième chez la femme derrière les pathologies cardiovasculaires. Les cancers les plus fréquemment diagnostiqués chez les hommes sont, dans l'ordre, poumon, colon et prostate ; tandis que chez les femmes il s'agit, dans l'ordre, des cancers du sein, colon et poumon.

La chirurgie représente le traitement de première intention permettant une résection de la tumeur. La radiothérapie et la chimiothérapie sont couramment utilisées en deuxième ligne, afin d'éliminer les cellules tumorales ayant échappé à la résection et aux métastases ou micro-métastases. Certaines chimiothérapies sont cependant utilisées avant toute chirurgie, on les appelle chimiothérapies néo-adjuvantes, permettant de diminuer la taille des tumeurs avant résection. Les traitements mis en place diffèrent selon la localisation, le stade et la nature du cancer, ce qui fait qu'il ait plus approprié de parler « des cancers » au pluriel plutôt que « du cancer » au singulier. De la même manière, on peut parler « des chimiothérapies » au pluriel.

Le développement des premières chimiothérapies anticancéreuses chez l'Homme débute au début des années 1940. Elles sont développées après avoir fait le constat que la chirurgie seule, ou en association avec les premières radiothérapies ne suffisent pas à guérir

les patients. En 1939, Charles Huggins met au point une hormonothérapie à base d'œstrogènes afin de traiter des patients atteints de cancer de la prostate (Huggins and Hodges, 1972). Ceci lui a valu le prix Nobel de médecine en 1966, et a constitué le premier traitement ciblé. L'utilisation au cours des deux guerres mondiales de gaz moutarde aura le triste intérêt de mettre en évidence les effets antiprolifératifs de ces moutardes. On s'est alors rendu compte que des personnes exposées à ces gaz avaient une déplétion importante des cellules immunitaires au niveau des ganglions lymphatiques et de la moelle osseuse. (Krumbhaar and Krumbhaar, 1919). C'est alors qu'en 1942, deux pharmacologues de l'université de Yale, Alfred Gilman et Louis Goodman ont décidé d'utiliser les propriétés antiprolifératives de ces moutardes à l'azote pour traiter des tumeurs cancéreuses, en utilisant des prodrogues telles que le chlorambucil ou le cyclophosphamide. (Gilman, 1946) (Goodman et al., 1946)

Dans les années 1950, les thiopurines ; 6-thioguanine et 6-mercaptopurine, ont été développées dans le traitement des leucémies (Heidelberger et al., 1957). Il s'agit d'analogues nucléosidiques qui vont s'insérer dans la double hélice d'ADN et entraîner la mort cellulaire. Dans le milieu des années 1950, le 5-Fluorouracile (5-FU) a été le premier agent chimiothérapeutique à avoir une action sur une grande variété de tumeurs solides (Hitchings and Elion, 1954) (Elion et al., 1954) Il appartient à la classe des antimétabolites, analogues de la pyrimidine.

Les années qui suivent, 1960, connaissent peu d'évolution, mise à part la découverte des vinca alcaloïdes ; taxanes qui vont avoir des effets sur le cytosquelette des cellules tumorales en prolifération.

La principale avancée dans la chimiothérapie adjuvante, c'est-à-dire suivant la chirurgie, est la mise au point d'associations de chimiothérapie telles que CMF (Cyclophosphamide,

méthotrexate, 5-Fluorouracile), VAMP (Vincristine, Améthoptérine (méthotrexate), 6-Mercaptopurine, Prédnisone).

Actuellement, les principaux agents cytotoxiques utilisés comprennent les alkylants, les antimétabolites (Kaye, 1998), les taxanes (Boven et al., 1993), les sels de platines (Fuentes et al., 2003), ou les inhibiteurs de topoisomérase (Denny and Baguley, 2003). L'inconvénient de ces molécules est qu'en agissant sur les cellules à division rapide, il n'y aura pas de discrimination entre les cellules tumorales et les cellules saines telles que les précurseurs hématopoïétiques, les cellules du tractus gastro-intestinal, qui sont des cellules à renouvellement rapide, pouvant entraîner de fortes toxicités (DeVita and Chu, 2008).

Aujourd'hui, des thérapies ciblées ont été mises au point. Contrairement aux chimiothérapies cytotoxiques qui vont principalement agir sur la division cellulaire en s'intercalant dans l'ADN, sans a priori, ces thérapies reposent sur une connaissance approfondie des mécanismes moléculaires mis en jeu (Kumar et al., 2012). Ainsi, grâce aux avancées des techniques de biologie moléculaire et cellulaire, il a pu être mis en évidence l'expression ou la surexpression de protéines, de récepteurs... au niveau de cellules tumorales. Ces protéines vont pouvoir être la cible de petites molécules qui vont interagir avec elles et inhiber leur action. Ainsi, ces molécules limiteront au maximum leur action aux cellules tumorales. Voici quelques exemples de cibles sur lesquelles agissent les thérapies ciblées : l'action pourra se faire, par exemple, au niveau de récepteurs membranaires en les bloquant, via des anticorps monoclonaux par exemple (trastuzumab, cetuximab...) (Del Mastro et al., 2012) (Gui and Shen, 2012) ; en bloquant les ligands des récepteurs membranaires (bevacizumab ciblant le VEGF) (Braghioli et al., 2012) ; ou encore en bloquant l'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase, en utilisant des inhibiteurs

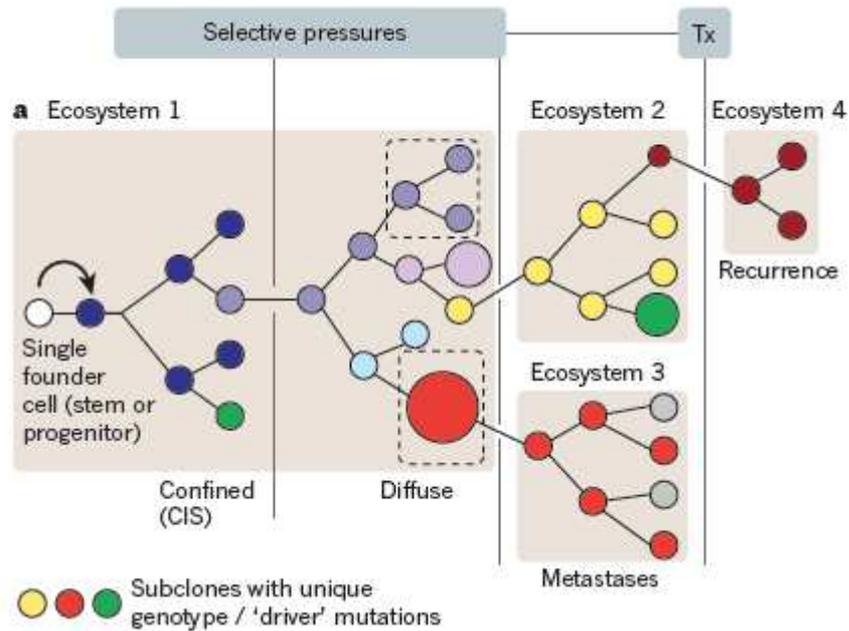


Figure 1 : Schéma représentant la pression de sélection clonale des tumeurs
(D'après Greaves et al., 2012)

Evolution clonale des cellules cancéreuses. La pression de sélection permet à certains clones mutant de se développer et d'échapper à tout traitement.

CIS : carcinome *in situ*

Tx : thérapie

de ces enzymes (sorafenib, sunitinib...) (Kudo, 2012). Ces nouvelles molécules ont permis un gain d'efficacité, et sont moins toxiques pour le patient.

Malheureusement, malgré le bénéfice apporté par tous ces traitements, ils ne permettent pas de guérir tous les patients notamment en raison du développement de résistances ; aussi bien aux chimiothérapies conventionnelles qu'aux thérapies ciblées.

Un des défis à prendre en compte dans le développement de nouvelles thérapies anticancéreuses, c'est la survenue de résistances, principales causes de l'échec des traitements. Elles peuvent être dues à des mécanismes intrinsèques à la tumeur, dans ce cas celle-ci est insensible à la chimiothérapie administrée, qui est donc inefficace pour le patient dès le début du traitement. Cela peut être la conséquence d'une mauvaise captation du médicament, d'une excrétion excessive de la drogue hors des cellules tumorales, d'une cinétique de métabolisation trop lente et/ou d'une mauvaise vascularisation de la tumeur (Rebucci and Michiels, 2013). D'autre part des mécanismes acquis peuvent se mettre en place (Piao et al., 2013) (West et al., 2013) (**figure 1**). Une tumeur ayant été chimio-sensible, peut devenir résistante par des mécanismes tels que la diminution de la captation du médicament, l'augmentation de l'activité enzymes de conjugaison qui éliminent les composés cytotoxiques hors des cellules tumorales, mais aussi des enzymes de réparation de l'ADN, l'augmentation de l'expression de la cible pharmacologique (récepteur, protéine de signalisation...) par exemple. Dans ce cas le patient répond au traitement et bénéficie des avantages de celui-ci durant un certain temps puis devient réfractaire à cette thérapie. (El Maalouf et al., 2009) (Pilati et al., 2012)

Une nouvelle voie conduisant à la résistance aux chimiothérapies concerne la présence de cellules souches cancéreuses dans les tumeurs (Reya et al., 2001) (Ghiaur et al., 2012). Ces cellules seraient à l'origine de l'apparition de certaines métastases et de récives. L'échec

des traitements sur les cellules souches cancéreuses, s'explique par leur faible potentiel de prolifération, alors que la majorité des thérapeutiques actuelles ciblent des cellules en division rapide.

Une des causes les plus problématiques dans l'apparition de résistances est la sélection clonale d'une cellule tumorale ayant subi une succession de mutations la rendant insensible à toute chimiothérapie (Basile and Aplin, 2012). Ce genre de résistances est le résultat d'une évolution clonale et d'une sélection de cellules tumorales résistantes à tout traitement (Diaz et al., 2012) (Aparicio and Caldas, 2013).

Un des moyens qui pourrait permettre d'échapper à ces résistances, est d'utiliser des associations thérapeutiques. Le ciblage des cellules souches cancéreuses pourrait également être une solution intéressante, ces dernières représentent un « réservoir » pour les récives. En effet, étant donné que la plupart des thérapies anticancéreuses administrées s'attaquent principalement aux cellules à renouvellement rapide, celles-ci n'auront que très peu d'effets sur les cellules souches cancéreuses qui ne se divisent quasiment pas. L'amélioration de la compréhension la biologie des cancers et du microenvironnement tumoral a permis d'identifier de nouvelles cibles et d'envisager de nouvelles stratégies. L'onco-immunologie et l'immunothérapie connaissent une nouvelle orientation avec le développement de vaccins, ou d'anticorps monoclonaux provoquant une réponse immunitaire dirigée contre la tumeur. (Hoos and Britten, 2012) De plus, le rôle de la mort immunogénique des cellules tumorales après un traitement chimiothérapique apparaît comme déterminant dans la réussite du traitement (Kroemer et al., 2013) (Vacchelli et al., 2012).

La nécessité d'innover afin d'avoir des traitements performants amène à s'intéresser à de nouvelles stratégies. La thérapie génique est l'une des techniques envisageable. Dans la première partie de ce manuscrit, après un rappel sur le principe de la thérapie génique,

nous nous intéresserons à ses applications en thérapie anticancéreuse. Nous nous focaliserons sur l'une d'entre elles : la thérapie dite « gène suicide » encore appelée Gene Directed Enzyme Prodrug Therapy (GDEPT).

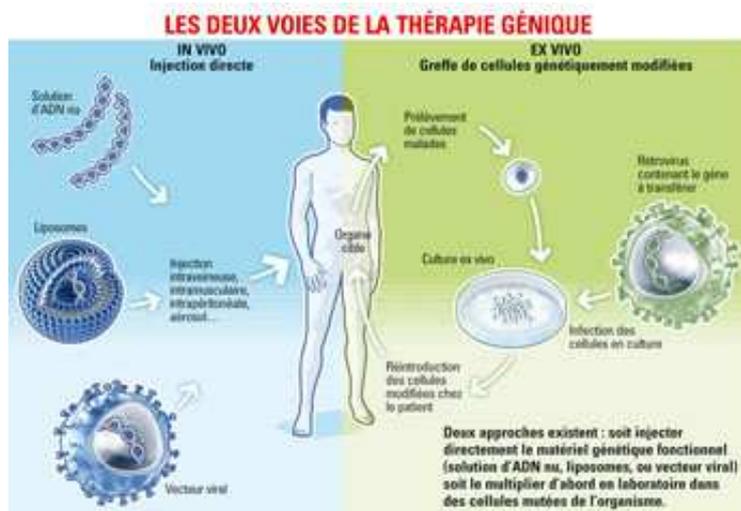


Figure 2 : Principe générale de la thérapie génétique.

(D'après Catherine Caillaud pour le journal du CNRS, 2006)

Représentation des 2 voies de la thérapie génétique : *in vivo* et *ex vivo*.

Les techniques *in vivo* consistent au transfert directement dans l'organisme d'un gène.

Les techniques *ex vivo* consistent au transfert d'un gène dans des cellules en culture qui seront réinjectées au patient.

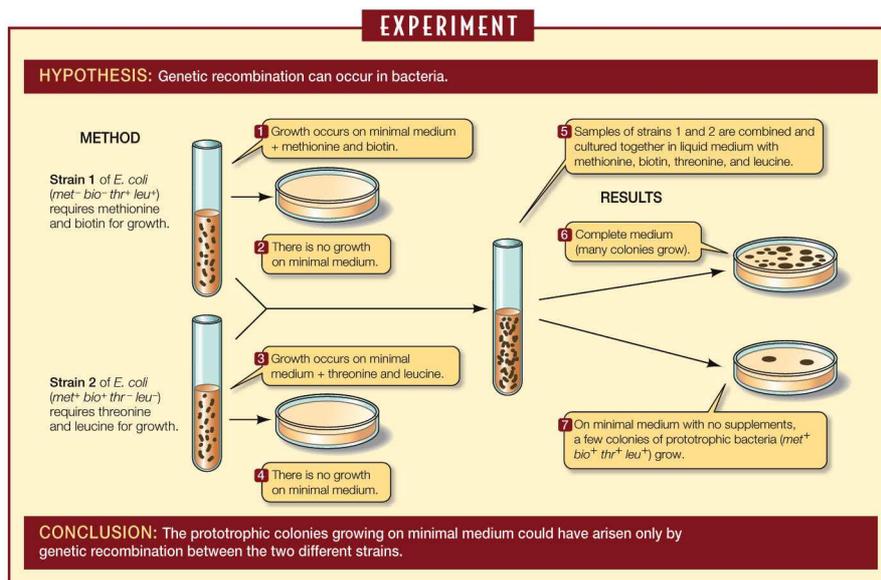


Figure 3 : Protocole de l'expérience de Lederberg et Tatum sur le transfert de matériel génétique entre bactéries.

(D'après The Science of Biology, 8th edition, 2008)

Des bactéries de différentes souches, poussant des milieux de culture supplémentés par des acides aminés de sélection, sont mélangées. Les bactéries sont ensuite réensemencées dans des boîtes de pétri contenant différents milieux de culture de sélection puis on observe le nombre de colonies qui poussent.

PARTIE I : LA THÉRAPIE GÉNIQUE DU CANCER

CHAPITRE I THÉRAPIE GÉNIQUE ET CANCER

La thérapie génique, en général, consiste en l'introduction, dans une cellule cible d'un gène thérapeutique dans le but de produire une protéine absente ou sous-exprimée, et en particulier de produire une protéine pouvant entraîner la mort cellulaire en thérapie anticancéreuse (**figure 2**). Seule la thérapie génique somatique est autorisée chez l'Homme.

Depuis les années 1930 et la découverte du potentiel de transfert de gène entre micro-organismes, les chercheurs ont développé ces techniques *in vitro* puis *in vivo* (Wirth and Yla-Herttuala, 2013) (**figure 3**). En 1958, Joshua Lederberg a reçu le Prix Nobel de médecine pour ses découvertes sur les transferts de matériel génétique entre deux bactéries (Tatum and Lederberg, 1947). La possibilité d'utiliser des virus comme vecteurs de transfert a été envisagée lorsqu'a été mise en évidence l'insertion de matériel génétique étranger dans un chromosome de cellule infectée par un virus SV-40 (Sambrook et al., 1968). C'est en 1966 qu'Edward Tatum évoque la possibilité d'utiliser des virus pour transférer des gènes dans des cellules somatiques avec une visée thérapeutique. Mais il faudra attendre 1989 pour que la première autorisation de conduire un essai de thérapie génique chez l'Homme soit attribuée par le Recombinant DNA Advisory Committee (RAC) aux Etats-Unis. Dans ce travail, des lymphocytes ont été modifiés génétiquement à l'aide d'un rétrovirus puis réinjectés à des patients atteints de mélanome (Rosenberg et al., 1990). Cinq patients ont été inclus dans cette étude. Des lymphocytes, infiltrant les tumeurs, ont été prélevés chez ces patients puis mis en culture durant 30 à 65 jours. Au bout de 8 à 19 jours une partie des cellules des patients ont été infectées à l'aide d'un vecteur rétroviral permettant

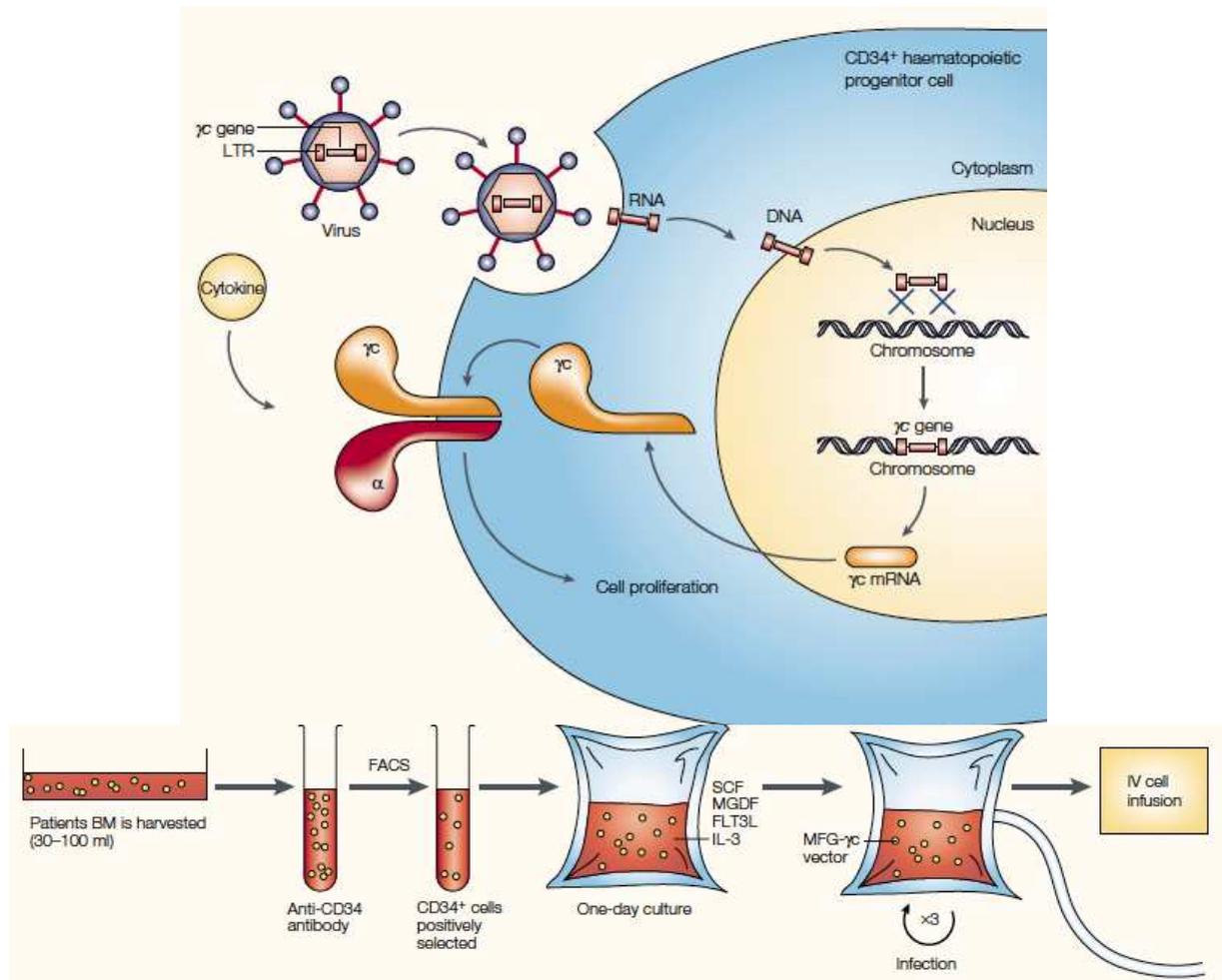


Figure 4 : Principe et protocole de la thérapie génique des enfants atteints de SCID-X
(D'après Fischer et al., 2002)

Les cellules CD34⁺ sont incubées, ex vivo, en présence de rétrovirus permettant l'expression du gène du récepteur gamma des cytokines. L'ARN viral est rétrotranscrit en ADN qui va s'intégrer au génome de la cellule

De la moelle osseuse du patient est prélevée et les cellules CD34⁺ sont sélectionnées. Ces cellules sont dans un premier temps incubées avec des cytokines qui vont entraîner des signaux de survie et de prolifération, avant d'être infectées avec les rétrovirus, contenues dans des sacs en présence de fibronectines qui vont faciliter les interactions cellules-virus. Après quatre jours de procédures, les cellules sont lavées et injectées au patient par voie intraveineuse, sans thérapie additionnelle.

l'expression du gène de résistance à la néomycine. Plusieurs cycles d'injection de cellules lymphocytaires génétiquement modifiées et d'IL2 ont été réalisés, variant d'un patient à l'autre. Des expériences de PCR ont pu mettre en évidence l'expression du transgène chez les patients, de manière prolongée dans le temps et sans prolifération clonale. Il s'agit du premier protocole mettant en évidence la faisabilité de la technique de transfert de gène chez l'Homme. L'année suivante, la FDA (Food and Drug Administration) autorise un protocole utilisant cette fois-ci un gène thérapeutique, l'adénosine désaminase, chez deux enfants souffrant d'une déficience en cette enzyme induisant une immunodéficiência sévère (Blaese et al., 1995). Les résultats ont été modestes mais ont permis de montrer la faisabilité de la technique. Les essais se multiplient dans les années 1990 jusqu'au jour où un patient est mort du fait de la thérapie génique. Ce patient de 18 ans, atteint d'une déficience en ornithine transcarbamylase a été inclus dans un essai utilisant un vecteur adénoviral pour transférer le gène de l'ornithine transcarbamylase. Cependant, il succomba quatre jours après l'administration d'une dose excessive d'adénovirus entraînant un choc anaphylactique provoqué par une très forte réponse immunitaire (Carmen, 2001) (Stolberg, 1999) (Yarborough and Sharp, 2009).

En 2000, les premiers succès de la thérapie génique sur des enfants atteints d'immunodéficiência sévère, ont fait renaître de grands espoirs quant au développement de cette stratégie (Cavazzana-Calvo et al., 2000). Des enfants atteints d'un déficit immunitaire combiné sévère lié à X1 (X1-SCID (X-linked sévère combined immunodeficiency ; déficience liée au chromosome X) ; déficience dans un récepteur à l'interleukine, qui touche les garçons) ont pu être guéris grâce au transfert dans leurs propres cellules souches hématopoïétiques du gène du récepteur gamma à l'interleukine 2 (IL2RG) (**figure 4**). Pour cela, des cellules souches hématopoïétiques des patients ont été prélevées puis infectées, *ex vivo*, à l'aide d'un vecteur rétroviral permettant l'expression du gène IL2RG. Après

expansion des cellules en culture, celles-ci ont été réinjectées au patient afin qu'elles recolonisent la moelle osseuse et se différencient en cellules immunitaires avec une expression correcte d'IL2RG. Malheureusement, la survenue d'évènements graves comme des leucémies, quelques années après le début du traitement, chez certains enfants pose la question de l'innocuité des vecteurs utilisés. Deux enfants traités ont développé une prolifération anarchique de lymphocytes T du fait d'une mutagenèse d'insertion survenue au locus du proto-oncogène LMO-2. Trois autres enfants traités ont connu une prolifération clonale de lymphocytes T, entraînant l'arrêt immédiat de l'essai en cours ainsi que le développement d'autres durant plusieurs années. Plus de dix ans plus tard, les essais ont repris et les enfants traités pour leucémie se portent bien, mais la question de la sécurité liée à l'utilisation de vecteurs rétroviraux se pose.

Plus récemment, des études ont été menées sur une pathologie affectant le système nerveux : l'adrénoleucodystrophie liée au chromosome X. Cette maladie qui touche les jeunes garçons entre 5 et 12 ans dans sa forme cérébrale et les jeunes hommes entre 20 et 30 ans dans une forme appelée adrénomyélongueuropathie, entraînant notamment des paraplégies, est due à un déficit en une enzyme du métabolisme et du transport des acides gras (ALD), codée par le gène ABCD1 (ATP-binding cassette D1).

La seule thérapie actuellement disponible, consiste à la transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques. Bien que la technique soit efficace dans une majorité de cas, elle se heurte cependant à la disponibilité de donneurs compatibles (Cartier and Aubourg, 2010).

L'idée de l'équipe de Nathalie Cartier, a été de corriger ce déficit en introduisant le gène fonctionnel dans des cellules souches hématopoïétiques du patient. Le protocole consiste à prélever des cellules souches hématopoïétiques du patient puis de les isoler en culture ;

après quoi ces cellules sont infectées à l'aide d'un lentivirus recombinant, dérivé de VIH-1, afin de leur faire exprimer le gène déficient ABCD1. Le patient est ensuite préparé pour que les cellules lui soient réinjectées ; il est alors placé en aplasie médullaire après traitement au cyclophosphamide et busulfan, deux puissants immunosuppresseurs à forte dose. Les cellules génétiquement modifiées sont alors injectées au patient (Biffi et al., 2011). Quatre patients ont été inclus dans une étude clinique de phase I/II pour montrer l'efficacité du traitement. Les premiers résultats à long terme ont été obtenus sur deux patients : il s'agit de deux enfants de 7 ans et 7 ans et demi au moment de l'inclusion dans l'étude. Après réinjection des cellules génétiquement modifiées, une amélioration globale des signes cliniques a pu être observée, avec une persistance dans le temps sans rechute plus d'un an après le début du traitement (Cartier et al., 2009).

D'autres types de leucodystrophies, par exemple la leucodystrophie métachromatique, sont étudiées afin de pouvoir être traitées par transfert de gène. Il s'agit d'une maladie neurodégénérative causée par un déficit en une enzyme lysosomale : l'arylsulfatase A lysosomale (ARSA). Des essais ont été réalisés en utilisant un vecteur AAV, les premiers protocoles chez le primate non-humain ont permis de mettre en évidence la faisabilité et la non-innocuité des vecteurs (Sevin et al., 2006) (Colle et al., 2010).

Aujourd'hui, pour une majorité de personnes encore, la thérapie génique ne concerne que les maladies génétiques rares. Les maladies candidates à la thérapie génique sont des maladies monogéniques, héréditaires, telles que l'hémophilie, la mucoviscidose... dont la cause est le mauvais fonctionnement d'un gène. Or, actuellement à travers le monde, le cancer arrive en tête des indications d'essais cliniques de thérapie génique devant les maladies monogéniques et les maladies cardiovasculaires. En 2013, 64.3% (1223) des essais cliniques de thérapie génique concernaient des stratégies anticancéreuses (<http://www.abedia.com/wiley/indications.php>); ce qui fait que des maladies infectieuses,

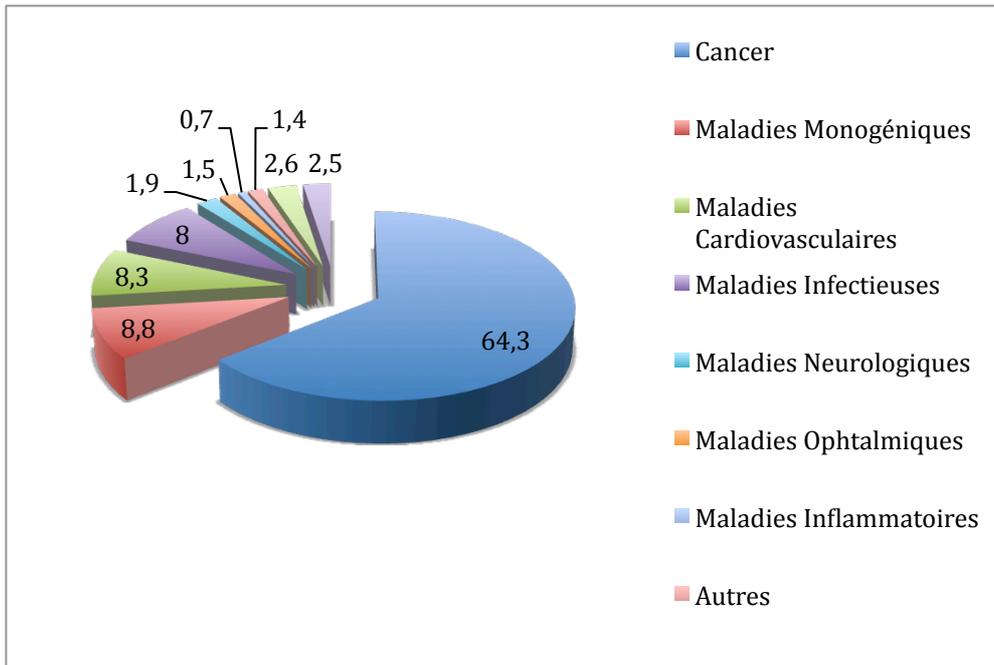


Figure 5 : Répartition des essais cliniques de thérapie génique en fonction des pathologies traitées (<http://www.abedia.com/wiley/indications.php>).

Statistiques pour l'année 2013. Le cancer représente la grande majorité des essais de thérapie génique menés à travers le monde.

ou dues à des anomalies génétiques multiples et acquises comme par exemple le cancer sont aussi de bons candidats à la thérapie génique (**figure 5**).

Des exemples de thérapies géniques appliquées au cancer seront décrits dans la suite de ce manuscrit.

I STRATÉGIES ANTITUMORALES

I.1 GÈNES SUPPRESSEURS DE TUMEURS

Les gènes suppresseurs de tumeur, aussi appelés anti-oncogènes, jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie cellulaire. Dans les cellules cancéreuses leur expression est très fréquemment déficiente voire absente du fait de mutations ponctuelles, de délétions ou d'insertion dans le génome de la cellule (Muller and Vousden, 2013) (Kato et al., 2013) (Zimonjic and Popescu, 2012). Parmi les gènes suppresseurs de tumeur on peut citer PTEN, p53, p16, FHIT, RASSF1, APC, RB1, WT1, MLH1... Le gène p53 est muté dans une majorité de cancer (Vogelstein and Kinzler, 1992). D'autres gènes suppresseurs de tumeurs sont plus spécifiques d'un type de cancer, comme par exemple les gènes BRCA 1-2 dans les cancers du sein et des ovaires (Scully, 2000). Les gènes suppresseurs de tumeur vont coder pour des protéines agissant notamment sur le cycle cellulaire pour réguler la croissance, la prolifération et la mort cellulaire (Muller and Vousden, 2013) (Totonchy et al., 2013).

Il a été montré expérimentalement (Ventura et al., 2007) que la réintroduction d'un gène suppresseur de tumeur fonctionnel dans des cellules tumorales entraînait une régression tumorale, notamment due à l'apoptose et sénescence de celles-ci (Xue et al., 2007).



Figure 6 : Flacon de Gendicine® première thérapie anticancéreuse commercialisée au monde

La Gendicine® est la première thérapie génique anticancéreuse commercialisée au monde ; mais limitée au seul marché chinois à l'heure actuelle.

Il s'agit d'un vecteur adénoviral permettant l'expression de la protéine p53.

Partant de ce constat, l'idée a donc été de réintroduire le gène suppresseur de tumeur déficient ou absent par transfert de gène.

En 1996, Roth et al. ont été les premiers à tester une thérapie génique utilisant le gène p53 chez l'Homme à l'aide d'un vecteur rétroviral, dans des cas de cancers du poumon (Roth et al., 1996). L'injection intratumorale du vecteur exprimant le gène p53 humain, sous le contrôle du promoteur de la β -actine, a été réalisée par une méthode bronchoscopique. Neuf patients ayant un cancer du poumon, et pour lesquels les traitements avaient échoué, ont été inclus dans cet essai de phase I. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence une mort cellulaire par apoptose dans la tumeur après injection du vecteur. De plus chez 3 patients une régression de la tumeur a été mise en évidence, et chez 3 autres une stabilisation de la taille.

D'autres ont, par la suite, mené des essais cliniques (principalement phase I/II) en transférant le gène p53 sauvage, par voie systémique ou en injection intratumorale ; dans différents types de cancer (Lang et al., 2003) (Wolf et al., 2004) (Tolcher et al., 2006) (Shimada et al., 2006) (Keedy et al., 2008) (Guan et al., 2009) (Senzer et al., 2013). Si ces études ont permis de montrer la faisabilité et la non-toxicité de la méthode, les effets sur les signes cliniques ont été modestes, se limitant le plus souvent à la zone d'injection du vecteur. Des essais utilisant des nanoparticules ont été menés. Ces dernières permettent de mieux cibler les tumeurs et les métastases de par leur taille.

En 2003, la Chine a été le premier pays à commercialiser un vecteur adénoviral, sous le nom de Gendicine[®], permettant l'expression de la protéine humaine p53 (Peng, 2005) (Wilson, 2005) pour le traitement des cancers ORL (**figure 6**). Des essais cliniques sont également en cours pour le traitement de toutes les tumeurs solides. Lors des phases de développement, en phases II/III, 135 patients atteints de tumeurs ORL ont été inclus dans

ces essais entre novembre 2000 et mai 2003, et ont reçu 8 injections (une par semaine, soit 8 semaines de traitement) du vecteur adénoviral dans la tumeur, en association avec des cures de radiothérapie. 64% des patients ont eu une régression totale de la tumeur et 29% une régression partielle. D'un point de vue sécurité et tolérance, aucun effet secondaire notable n'a été mis en évidence durant l'étude. Plus tard, 240 patients atteints de différentes tumeurs solides ont été traités avec Gendicine[®] en association avec de la radiothérapie et il a été montré que l'efficacité du traitement était améliorée d'un facteur 3,4 en présence de Gendicine[®] (Peng, 2005). Cependant la Gendicine[®] n'a jamais reçu d'autorisation de mise sur le marché en Europe et aux Etats-Unis, ne se limitant qu'au seul marché chinois. Certains experts occidentaux reprochent un manque de transparence sur la publication des résultats et de toutes les données cliniques, allant jusqu'à remettre en cause les résultats obtenus.

Malgré cela, de nouveaux vecteurs avec le gène p53 sont en cours de développement à travers le monde, et les résultats obtenus *in vitro* restent encourageants et prometteurs.

Des études sont actuellement menées pour mettre au point de nouveaux gènes suppresseurs de tumeurs à transférer dans les tumeurs, parmi lesquels PTEN par exemple (Mathews et al., 2012) (Li et al., 2013).

I.2 THÉRAPIE GÉNIQUE ET IMMUNOTHÉRAPIE ANTITUMORALE

De nombreux scientifiques sont d'accord pour dire que le développement de la résistance de certains cancers serait, notamment, dû à un défaut du système immunitaire qui considère alors les cellules tumorales comme du soi. Le microenvironnement tumoral joue un rôle essentiel dans le développement d'une tolérance immunitaire vis-à-vis des cellules

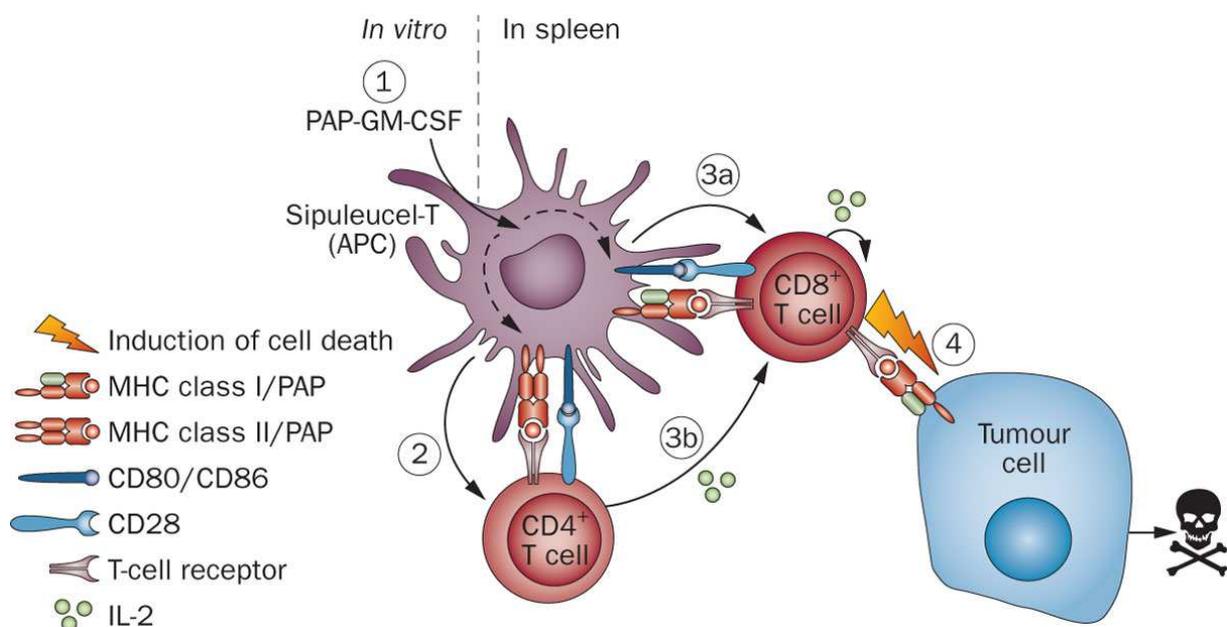


Figure 7 : Schéma du mécanisme d'action du Sipuleucel-T (Provenge®)

(D'après Geary et al., 2013)

Des cellules présentatrices d'antigènes maturées *in vitro* avec une protéine de fusion GM-CSF / PAP (phosphatase acide prostatique) (1) vont migrer vers la rate où ils vont présenter l'épitope de l'antigène PAP en association avec les molécules du CMH de classes I et II (flèches pointillées). Les Sipuleucel-T + cellules présentatrices d'antigènes activent les lymphocytes T CD4⁺ (2), produisant de l'IL2 (3b) qui va agir sur les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de PAP qui vont interagir avec le sipuleucel-T / cellules présentatrices d'antigènes (3a). Ces lymphocytes T vont ensuite induire l'apoptose des cellules tumorales (4).

MHC : Major histocompatibility class (complexe majeur d'histocompatibilité)

IL-2: Interleukine 2

tumorales, faisant intervenir un certain nombre d'acteurs parmi lesquels : des cellules présentatrices d'antigènes, des lymphocytes T régulateurs, des cytokines... Il a d'ailleurs été montré, par exemple, que les tumeurs ayant un microenvironnement dans lequel était présente une population importante de lymphocytes T régulateurs (LT rég), étaient de moins bon pronostic que celles avec une faible proportion de LT régulateurs (Adotevi et al., 2010). Des recherches permettant de stimuler les défenses immunitaires contre les tumeurs sont en cours, dont certaines sont basées sur le transfert de gène.

Cela consiste en la modification *ex vivo* de cellules dendritiques de patients, qui, réinjectées dans la circulation, vont être capables d'induire une réponse immunitaire contre la tumeur. L'idée est d'utiliser les propriétés de cellules présentatrices d'antigène. Les cellules dendritiques du patient sont prélevées, mises en culture, et infectées par un vecteur viral recombinant (l'utilisation de vecteurs non viraux est aussi envisageable) permettant l'expression d'un antigène tumoral. Aujourd'hui le sipuleucel-T (ou Provenge[®]) est le premier traitement à base de cellules dendritiques à avoir reçu une autorisation de mise sur le marché par la FDA aux Etats-Unis (avril 2010) et à être indiqué dans les cancers métastatiques de la prostate. Ce traitement est basé sur le prélèvement de précurseurs de cellules dendritiques qui seront mises en culture au contact d'une protéine de fusion appelée PA2024 (Jahnisch et al., 2010) (Carballido and Fishman, 2011) composée de la phosphatase acide prostatique (PAP) et de GM-CSF (Geary et al., 2013) (**figure 7**). Les résultats obtenus restent modestes puisque le traitement ne permet d'augmenter l'espérance de vie que de 4 mois seulement.

Une autre méthode visant également à stimuler les cellules présentatrices d'antigène dans le traitement immunologique des tumeurs est le développement de vaccins thérapeutiques contre le cancer. Il s'agit de « DNA vaccines », c'est-à-dire de transfert

d'une séquence d'ADN, un gène, qui codera pour une cytokine, un facteur de croissance, un antigène tumoral, par exemple (Senovilla et al., 2013). Basé sur le même principe qu'un autre transfert de gène, ils seront administrés via un vecteur de transfert, mais les plus développés actuellement sont basés sur des plasmides. Après transfection des cellules cibles, celles-ci vont être capable d'exprimer l'antigène sous forme de protéine ou de peptide avec l'avantage de subir les mêmes remaniements post-traductionnels que l'antigène tumoral. L'expression de cet antigène dans les cellules transfectées doit permettre d'induire une réponse immunitaire cellulaire spécifique dirigée contre cette protéine (Mackiewicz and Mackiewicz, 2010).

A l'heure actuelle, les essais cliniques menés ont montré des résultats modestes, notamment en raison du faible nombre de cellules transfectées et présentant donc l'antigène (Plate, 2011) (Yamada et al., 2013). Des recherches sont menées afin de perfectionner les systèmes d'immunothérapie en permettant une expression plus importante de l'ADN transfecté ou en favorisant la réponse immunitaire grâce à l'ajout d'adjuvants (Shurin et al., 2010). De plus de nouvelles stratégies de vaccinations ont montré des résultats précliniques encourageants.

Une autre technique de thérapie génique appliquée au cancer, la « gene directed enzyme prodrug therapy (GDEPT) », sera abordée après avoir décrit les différents types de vecteurs de transfert de gène actuellement utilisés ou en développement en clinique.

II LES VECTEURS DE TRANSFERT DE GÈNE

Le succès de la thérapie génique repose en grande partie sur une bonne stratégie de transfert de gène et donc dans l'efficacité du vecteur de transfert. Les vecteurs peuvent être définis comme des véhicules utilisés pour le transfert d'ADN ou d'ARN dans les cellules.

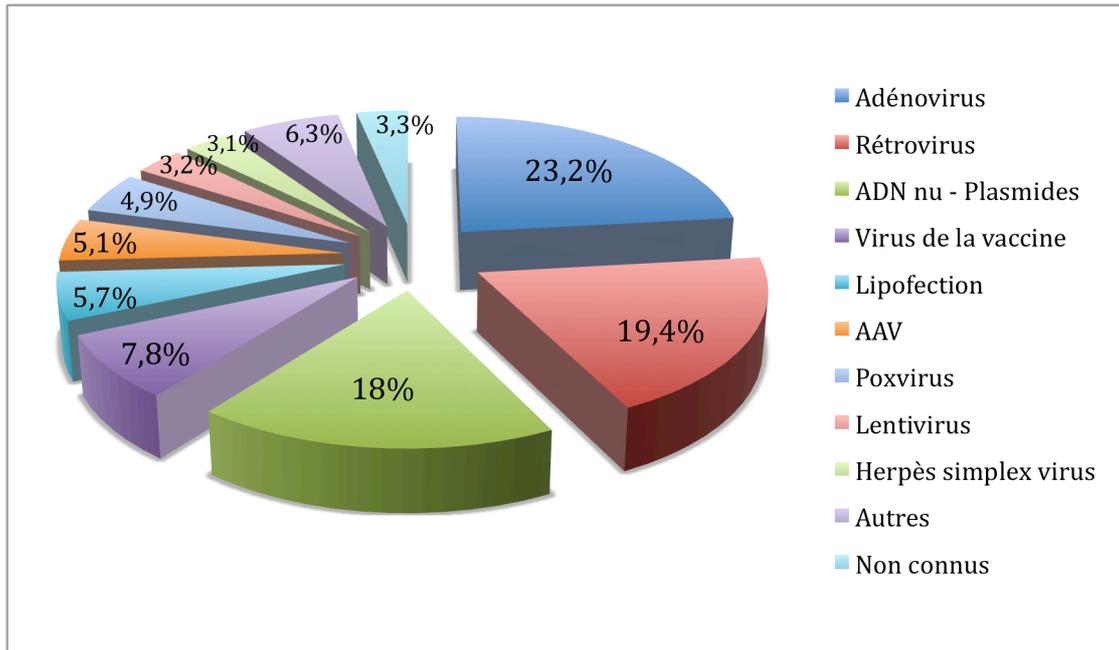


Figure 8 : Vecteurs viraux et non viraux utilisés dans des protocoles de thérapie génique

(<http://www.abedia.com/wiley/indications.php>)

Les vecteurs viraux sont majoritairement les plus utilisés ; les adénovirus étant les plus utilisés bien que la proportion diminue depuis quelques années.

Du fait de sa nature chimique, polyanionique (charges négatives des phosphates), et de sa taille, l'ADN est quasiment incapable de pénétrer passivement dans les cellules. C'est la raison pour laquelle il est nécessaire d'utiliser des vecteurs (physiques, chimiques ou biologiques) pour transférer l'ADN dans les cellules.

Le vecteur idéal doit permettre une transfection efficace et sélective de sa cible ; il doit permettre une bonne expression du transgène ; il ne doit pas être toxique et il doit être facile à produire.

Les vecteurs de transfert utilisés dans les essais cliniques et en développement peuvent être divisés en deux groupes : les vecteurs viraux et les vecteurs non viraux, dont nous verrons ici les principaux (**figure 8**).

II.1 LES VECTEURS VIRAUX

Les vecteurs viraux sont issus de virus génétiquement modifiés (Warnock et al., 2011). Ils ont été développés en remplaçant des gènes non essentiels impliqués dans la réplication virale, la production de protéines pathogènes... par des gènes thérapeutiques. Pour réaliser le transfert du gène à l'aide d'un vecteur viral, on se base sur le cycle viral naturel d'infection, qui consiste en l'introduction puis l'expression du génome viral dans la cellule infectée (Vannucci et al., 2013). Ainsi, après pénétration du vecteur viral celui-ci va soit libérer son matériel génétique dans le cytoplasme (état épisomal), soit s'intégrer dans le génome de la cellule cible ; puis grâce à la machinerie cellulaire, la ou les protéines codées par le génome du vecteur (transgène) seront exprimées.

A l'heure actuelle les virus représentent les vecteurs les plus utilisés dans les protocoles de thérapie génique puisqu'ils représentent plus des trois quarts des vecteurs utilisés. Les vecteurs viraux utilisés sont principalement basés sur des virus non réplcatifs, pour des

	Rétrovirus	Lentivirus	Adénovirus	AAV
Génome	ARN	ARN	ADN	ADN
Infection cellules quiescentes	NON	OUI	OUI	OUI
Intégration génome de la cellule hôte	OUI	OUI	NON	OUI (si gène rep)
Production haut titre	+	++	++++	+
Taille transgène inséré	8 kb	8 kb	30 kb	5 kb
Stabilité	++	++	+	++
Pré-immunité	NON	NON	OUI	OUI

Tableau 1 : Propriétés des principaux vecteurs viraux utilisés en thérapie génique

raisons de sécurité, exceptés les virus oncolytiques, qui ne sont utilisés qu'en thérapie génique du cancer (Alemany, 2012) (Alemany, 2013).

L'un des inconvénients des vecteurs viraux est la taille limitée du transgène que l'on peut insérer. La production à grande échelle des vecteurs viraux reste compliquée et les titres obtenus sont modestes pour certains. De plus les techniques de production des vecteurs viraux font intervenir des lignées cellulaires (le plus souvent HEK 293T) (Kotin, 2011), qui vont permettre la production des protéines virales et leur assemblage en une particule virale infectieuse. Le risque ici est une éventuelle recombinaison entre l'ADN du vecteur viral et le génome de la cellule d'emballage qui pourrait donner un génome mutant potentiellement dangereux (McClure et al., 2011).

Nous allons voir ici les principaux vecteurs viraux utilisés en transfert de gène (**tableau 1**).

II.1.1 LES RÉTROVIRUS

Les rétrovirus sont des virus enveloppés possédant un génome à ARN diploïde. Ils possèdent trois gènes de structures : le gène *gag* qui code pour les protéines du core de l'enveloppe, le gène *pol* qui code pour les protéines de la rétrotranscription, de l'intégration et de la protéolyse virale, et le gène *env* qui code pour les glycoprotéines du virus. Le génome est encadré par de longues répétitions terminales de tailles variables ou LTR (*long terminal repeat*), qui permettent l'intégration, l'encapsidation du génome et l'expression des gènes viraux (Maier et al., 2010).

Lors de l'infection d'une cellule, le virus suivra le cycle suivant : rétro-transcription du génome viral en ADN bicaténaire à l'aide d'une transcriptase inverse, dans le cytoplasme de la cellule ; migration de l'ADN dans le noyau où il sera inséré, de manière aléatoire, au génome de la cellule infectée grâce à une intégrase. L'intégration de l'ADN viral va

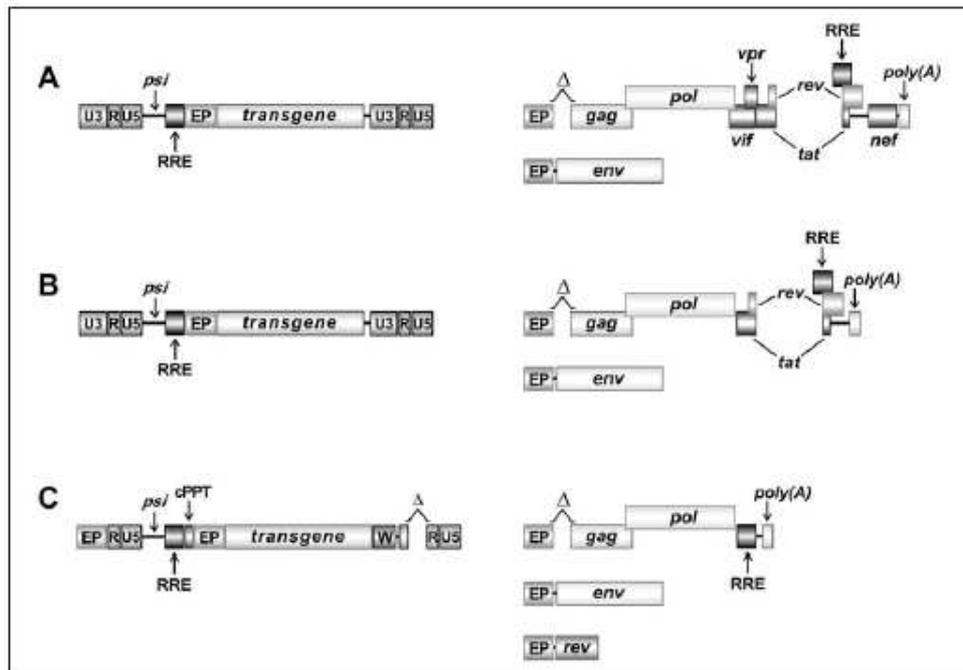


Figure 9 : Représentation schématique du génome de vecteurs lentiviraux

(D'après Vannucci et al., 2013)

A) génome des vecteurs lentiviraux de première génération. Il possède toujours les séquences LTR, le signal d'encapsidation (*psi*), la séquence RRE (Rev responsive element) nécessaire au transfert de l'ARN dans le noyau. En revanche la séquence *env* n'est pas présente, elle se trouve en trans.

B) génome des vecteurs lentiviraux de deuxième génération. Il ne varie pas beaucoup comparé à la précédente génération. Seules les gènes de régulation *vpr*, *vif*, *nef* ont été retirés.

C) génome des vecteurs lentiviraux de troisième génération. Ici toute la région U3 en 5' du génome a été enlevée. Le vecteur ainsi produit est appelé SIN pour self inactivating. Les séquences cPPT (central poly-purine tract) et la séquence de régulation W permettant d'augmenter l'efficacité de transfert nucléaire de l'ARN

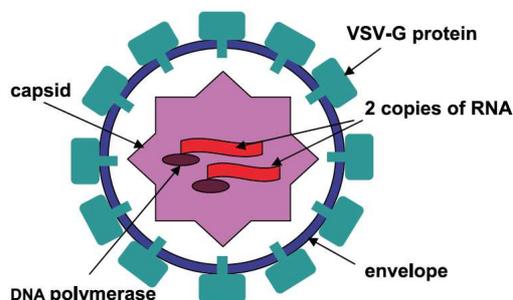


Figure 10 : Représentation schématique de la structure d'un vecteur lentiviral pseudotypés avec des glycoprotéines d'enveloppe VSV-G. (<http://www.intechopen.com>,

2012)

permettre une expression stable des protéines virales, dans le cas d'un virus pathogène, ou du transgène, pour un transfert de gène, mais cette intégration aléatoire peut engendrer des mutations et l'activation d'oncogènes (Gabriel et al., 2012).

Les rétrovirus ont la particularité de n'infecter que les cellules en division, ce qui en fait des vecteurs intéressants pour les cellules à prolifération rapide et donc les tumeurs.

Il s'agit des premiers virus utilisés en thérapie génique. Ils ont principalement été utilisés dans des stratégies dites *ex vivo*, c'est-à-dire quand des cellules du patient sont prélevées, mises en culture puis transfectées à l'aide d'un rétrovirus. Les cellules sont ensuite réinjectées au patient.

II. 1.2 LES LENTIVIRUS

Les lentivirus appartiennent à la famille des rétrovirus, il s'agit donc de virus enveloppés ayant un génome à ARN diploïde. (2 ARN (+) monocaténaire identiques d'environ 10 Kb). Ils possèdent les mêmes propriétés que les rétrovirus, mais possèdent des gènes supplémentaires : deux gènes régulateurs *tat* et *rev*, essentiels pour la réplication du virus ; et quatre gènes accessoires *vif*, *vpu*, *vpr* et *nef* (Sakuma et al., 2012) (**figure 9**).

Les vecteurs lentiviraux utilisés sont, le plus souvent, issus du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Les autres souches virales qui ont été testées sont le virus de l'immunodéficience simien (SIV), félin (FIV)... (Picanco-Castro et al., 2012)

Contrairement aux autres rétrovirus, les lentivirus sont capables d'infecter aussi bien des cellules en division que des cellules quiescentes. Pour abolir le tropisme des lentivirus pour les cellules immunitaires, un des moyens mis en œuvre est le pseudotypage : cela consiste à modifier les protéines d'adhésion des membranes virales afin de faire exprimer des protéines qui, ne sont pas spécifiques des cellules immunitaires. Ce type de modification permet d'abolir ou de modifier un tropisme pour certains types cellulaires mais aussi, de

cibler plus spécifiquement d'autres cellules en restreignant le pouvoir infectieux des virus. Le plus souvent les lentivirus sont pseudotypés avec la protéine membranaire du virus VSV-G (vesicular stomatitis virus) (**figure 10**). Cette protéine assure un tropisme large au vecteur, ne limitant pas le lentivirus à son seul tropisme pour les cellules immunitaires ; de plus elle permet d'avoir de meilleurs rendements lors de la production de vecteurs viraux lors de l'étape de concentration, comparé à d'autres protéines utilisées pour pseudotyper le virus. Ce point sera détaillé dans la partie ciblage. Des études sont actuellement en cours pour améliorer la production (Tiscornia et al., 2006).

Concernant les lentivirus, on peut également ajouter que même si le risque de mutagenèse d'insertion est diminué par rapport aux rétrovirus, il semble ne pas être nul et doit être pris en considération dans chaque protocole (Schambach et al., 2013).

Des vecteurs lentiviraux non-intégratifs sont en développement, et permettent d'avoir les avantages du lentivirus (faible immunogénicité, pseudotypage...) en évitant d'avoir une intégration dans le génome de la cellule hôte ; annulant le risque d'insertion du vecteur dans des sites à risques et permettant une expression transitoire du transgène dans les cellules. Pour obtenir cette propriété, le gène de l'intégrase, enzyme qui va participer à l'intégration du transgène dans le génome de la cellule hôte, est muté ou délété et donc non fonctionnel. Le principal frein à leur développement est le mauvais rendement obtenu lors de leur production (Banasik and McCray, 2010) (Sarkis et al., 2008) (Wanisch and Yanez-Munoz, 2009).

Au cours de ce travail de thèse nous avons utilisé des vecteurs lentiviraux intégratifs de dernière génération, pseudotypés avec la glycoprotéine membranaire VSV-G. Le promoteur utilisé est e1F α long permettant une bonne expression du transgène.

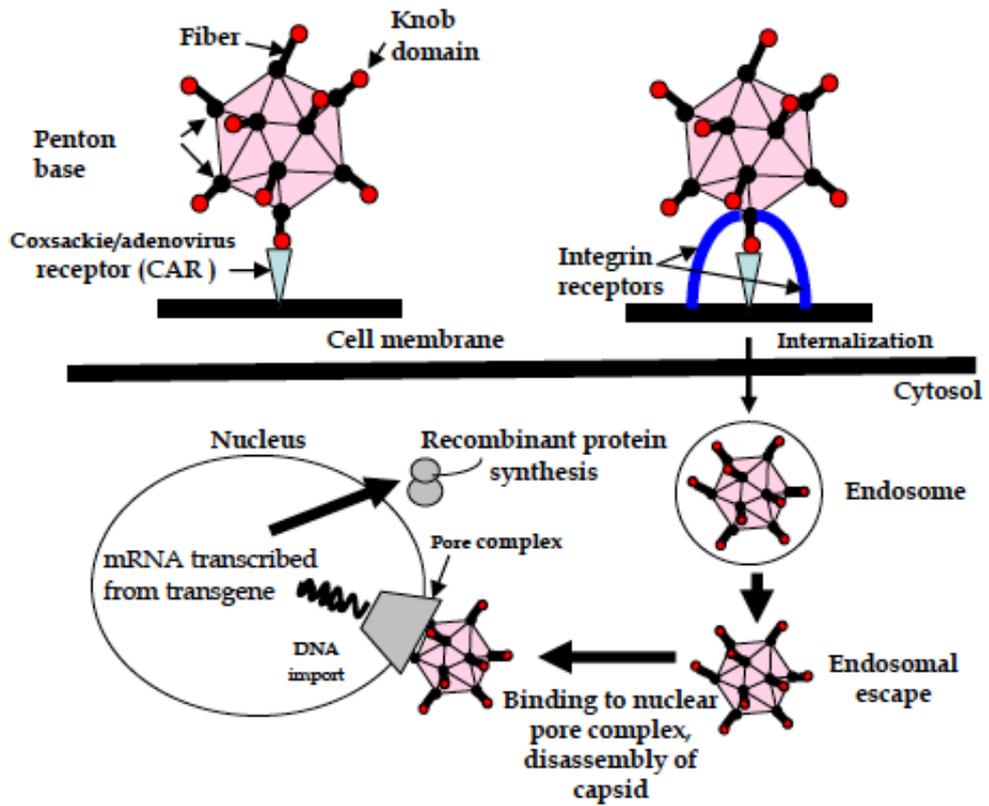


Figure 11 : Interactions et internalisation d'un vecteur adénoviral avec sa cellule cible

(D'après Touati et al., 2011)

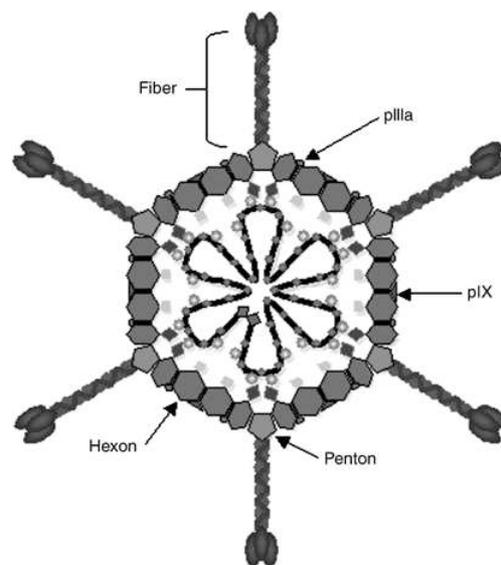


Figure 12 : Représentation schématique d'un adénovirus

(D'après Glasgow et al. 2006)

II. 1.3 LES ADÉNOVIRUS

Les adénovirus sont des virus appartenant à la famille des *Adenoviridae*, nus (non-enveloppés) de forme icosaédrique, possédant un génome à ADN double brin d'environ 35 Kb. Chez l'Homme, ils sont responsables d'infections bénignes et peu pathogènes, notamment au niveau des voies aériennes supérieures (Ruuskanen et al., 1985) (Wadell, 1984). Il existe une cinquantaine de sérotypes différents dont les plus étudiés sont les sérotypes 2 et 5, qui sont les plus utilisés en vectorologie adénovirale (Erdman et al., 2002). Le génome des adénovirus est composé de cinq gènes dont l'expression est précoce (E1 à E5, pour *early*), deux gènes intermédiaires et cinq gènes tardifs (L1 à L5, pour *late*) (Altaras et al., 2005).

L'infection par les adénovirus met en jeu l'interaction entre une fibre de la particule virale et un récepteur cellulaire CAR (*Coxsackie and Adenovirus Receptor*) (Bergelson, 1999) (**figure 11**). Ce récepteur est exprimé sur un large spectre de types cellulaires expliquant son large tropisme. Il joue un rôle important dans le tropisme hépatique de l'adénovirus lors d'une injection intraveineuse (Vrancken Peeters et al., 1996). Les protéines penton base (**figure 12**) de l'adénovirus joue aussi un rôle dans l'internalisation du virus en interagissant avec les intégrines. Le génome viral reste à l'état épisomal dans les cellules, ne permettant qu'une expression transitoire du transgène dans les cellules en division. En revanche cette expression peut être prolongée dans les cellules quiescentes.

Les adénovirus de première génération, ont été modifiés en retirant le gène E1 responsable de l'activation des autres gènes de l'adénovirus afin de le remplacer par le transgène. La taille de l'insert pouvant être intégré étant faible, le gène E3 impliqué dans la production de protéines non essentielles a été retiré, permettant d'augmenter jusqu'à 7,5 kb la taille de celui-ci. Ces vecteurs de première génération présentent cependant des inconvénients liés à

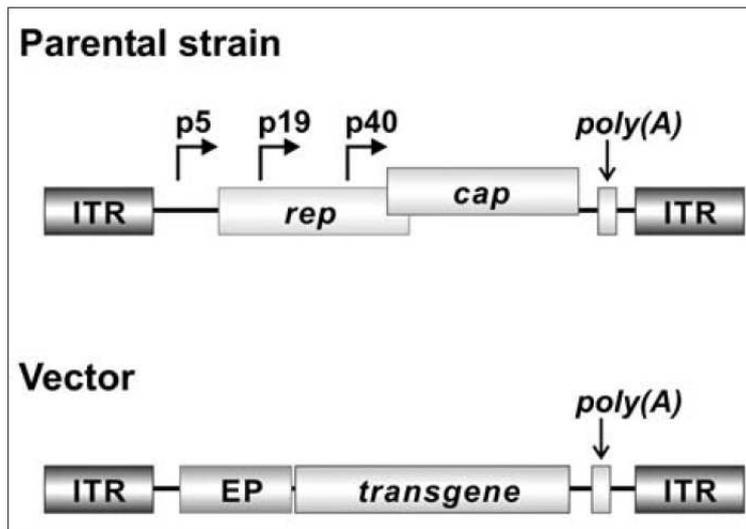


Figure 13 : Génome de l'AAV (parental strain) et de vecteurs AAV (vector)

(D'après Vannucci et al. 2013)

Pour le génome du vecteur AAV, les gènes codant des protéines non essentielles ont été ôtés.

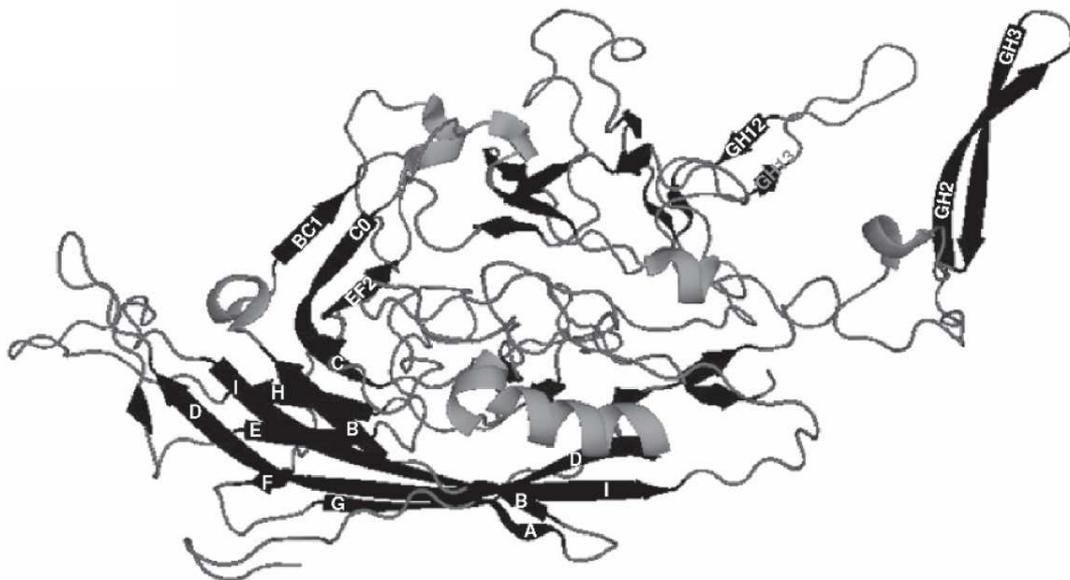


Figure 14 : Structure d'une sous-unité monomérique de l'AAV (pdb 11p3).

(D'après Xie et al., 2002)

des risques de recombinaisons homologues et à l'apparition de réponses immunitaires, réponse adaptative, après injection du vecteur (Ahi et al., 2011).

Pour limiter ces inconvénients des vecteurs de deuxième génération ont été développés : en plus des gènes précédemment supprimés, les gènes E4 et E2 ont également été retirés. Avec la suppression de ces gènes, le vecteur peut maintenant recevoir un transgène d'une taille de 9 à 10 kb. Ces vecteurs ont permis de diminuer les réponses immunitaires et les recombinaisons homologues mais ils sont difficiles à produire.

Les derniers vecteurs adénoviraux de troisième génération ou encore appelés « gutless » ou « helper-dependent », ne possèdent presque plus de séquences virales. Seuls les gènes essentiels ont été conservés (Alba et al., 2005). Ainsi, la taille du transgène pouvant être inséré peut aller jusqu'à 36 kb. Ces vecteurs ont l'avantage de n'entraîner des réponses immunitaires adaptatives limitées, mais des réponses immunitaires innées fortes (Silva et al., 2010) (Segura et al., 2008).

II. 1.4 LES AAV (ADENO-ASSOCIATED VIRUS) : VIRUS

ASSOCIÉS À L'ADÉNOVIRUS

Un vecteur de plus en plus en vogue et qui connaît un développement important : les AAV, virus associés à l'adénovirus. Il s'agit de virus de la famille des *Parvoviridae*, ils sont non enveloppés et ont un génome formé d'ADN simple brin. A l'état sauvage, l'AAV ne peut se répliquer qu'en présence d'un virus auxiliaire qui peut être un adénovirus (d'où son nom) mais également le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) ou papillomavirus humain (HPV) par exemple.

Le génome de l'AAV (**figure 13**) possède deux gènes, *rep* et *cap*. Le gène *rep* code pour les protéines de réplication et le gène *cap*, qui possède deux cadres de lectures, code pour des protéines structurales VP1, VP2, VP3. Les gènes sont entourés par des séquences

identiques, appelées répétitions terminales inversées ou ITR (Inverted Terminal Repeat) indispensables pour l'encapsidation, l'intégration et la réplication (McCarty, 2008).

L'AAV est un virus qui peut s'intégrer dans le génome des cellules cibles. Cette intégration a la particularité d'être spécifique puisqu'elle se situe sur le locus AASV1 au niveau du chromosome 19. (Henckaerts and Linden, 2010) Il a été montré que cette intégration est *rep*-dépendante, ce qui signifie que l'expression du gène *rep* est nécessaire (Dyall et al., 1999) (Linden et al., 1996) Si le gène *rep* n'est pas exprimé, le génome du virus restera à l'état épisomal dans la cellule. La première utilisation d'un AAV comme vecteur remonte à 1984 ; à l'époque le vecteur conservait ses capacités d'intégration au niveau du chromosome 19 (Hermonat and Muzyczka, 1984) (Deyle and Russell, 2009). Aujourd'hui les vecteurs utilisés n'ont plus ces séquences virales ne conservant que les ITR, ce qui permet d'augmenter la capacité de taille de l'insert à 4,6 kb (Pereira et al., 1997).

Un des inconvénients à l'utilisation de vecteurs AAV réside dans le fait que près de 80% de la population mondiale possède une immunité contre le sérotype 2 et 30 à 40% possède des anticorps (Moskalenko et al., 2000). De plus la production de ces vecteurs à large échelle est encore fastidieuse (Ayuso et al., 2010).

Malgré ces inconvénients, ces virus sont actuellement utilisés en essais cliniques pour le traitement de la mucoviscidose, de l'hémophilie ou encore de myopathies (Tang et al., 2010) (Mendell et al., 2012) (Chuah et al., 2012).

II.2 LES VECTEURS NON VIRAUX

Les vecteurs non viraux ont l'avantage d'être plus faciles à produire et à stocker que les virus et présentent moins de risques dans leur utilisation. Ils permettent également de s'affranchir des limites de taille des gènes thérapeutiques, posées par les vecteurs viraux (Mellott et al., 2013). Cependant ils présentent l'inconvénient d'être, à l'heure actuelle,

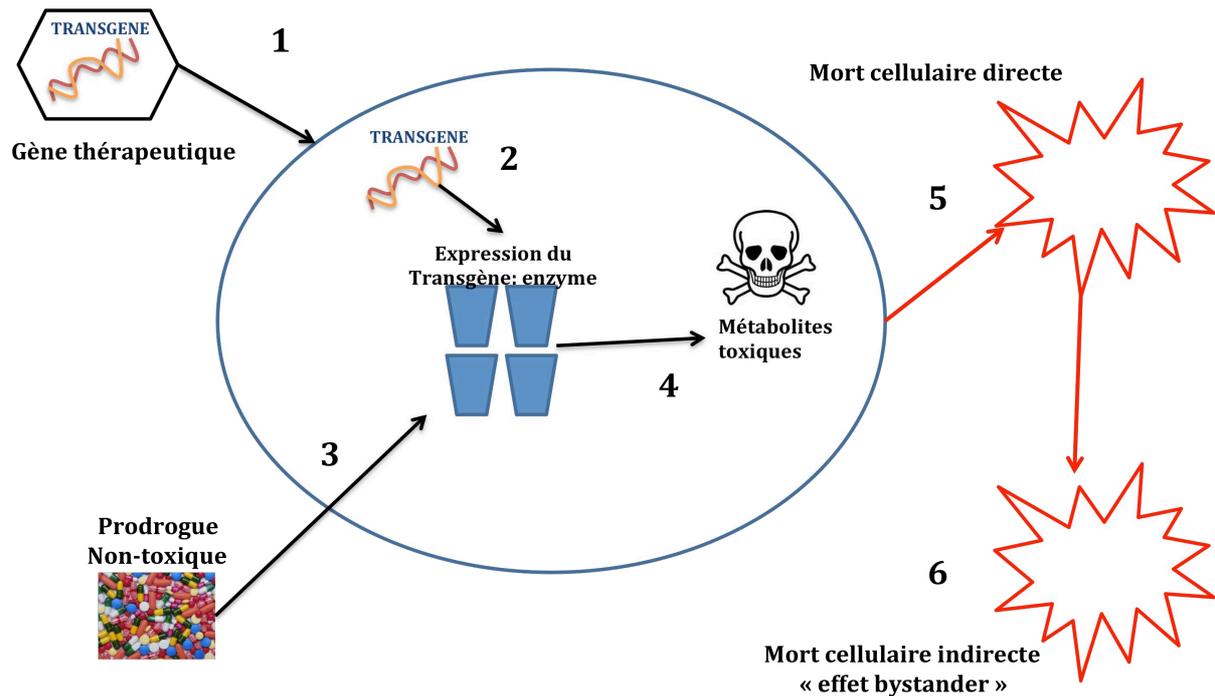


Figure 15 : Principe de la Gene Directed Enzyme Prodrug Therapy (GDEPT) ou thérapie gène suicide

1) La première étape consiste au transfert du gène de l'enzyme, métabolisant la prodrogue, à l'aide d'un vecteur. 2) Expression du transgène. 3) Administration de la prodrogue anticancéreuse. 4) Métabolisation de la prodrogue en métabolites cytotoxiques. 5) Mort cellulaire directe de la cellule exprimant l'enzyme. 6) Mort cellulaire indirecte des cellules avoisinantes n'exprimant pas l'enzyme.

moins efficace que les virus pour transférer l'information génétique ; l'efficacité dépend en grande partie de la charge de surface de ces vecteurs. De plus, il est très difficile de permettre une intégration dans le génome des cellules, limitant le nombre d'applications possibles.

De nombreux vecteurs non viraux ont été développés (plasmides, nanoparticules, liposomes...), nous ne les détaillerons pas ici.

III GENE-DIRECTED ENZYME-PRODRUG THERAPY (GDEPT)

III.1 PRINCIPE

La Gene-Directed Enzyme-Prodrug Therapy (GDEPT) est une stratégie de transfert d'un gène dit « suicide », d'où son nom de thérapie suicide. Cela consiste au transfert, dans la tumeur d'un gène codant pour une enzyme capable de métaboliser une prodrogue en métabolites cytotoxiques dans la cellule tumorale (**figure 15**). Une prodrogue peut être définie comme une entité chimique inerte, qui après métabolisation générera des métabolites cytotoxiques.

Bien qu'un certain nombre de drogues cytotoxiques entraînent la mort de 100% des cellules *in vitro*, l'efficacité *in vivo* est limitée du fait de toxicités et donc de limitations en terme de doses administrées. Il était donc nécessaire de développer une méthode qui permette de diminuer la toxicité et d'augmenter l'effet chimiothérapeutique.

Cette approche a été décrite pour la première fois en 1986 par Moolten (Moolten, 1986) qui utilisa le gène de la thymidine kinase du virus de l'herpès *simplex*.

L'avantage apporté par cette technique, est la production locale, au sein même de la tumeur, de métabolites cytotoxiques. Cette métabolisation *in situ* de la prodrogue permet d'améliorer l'efficacité de la chimiothérapie en évitant le transport sanguin des métabolites

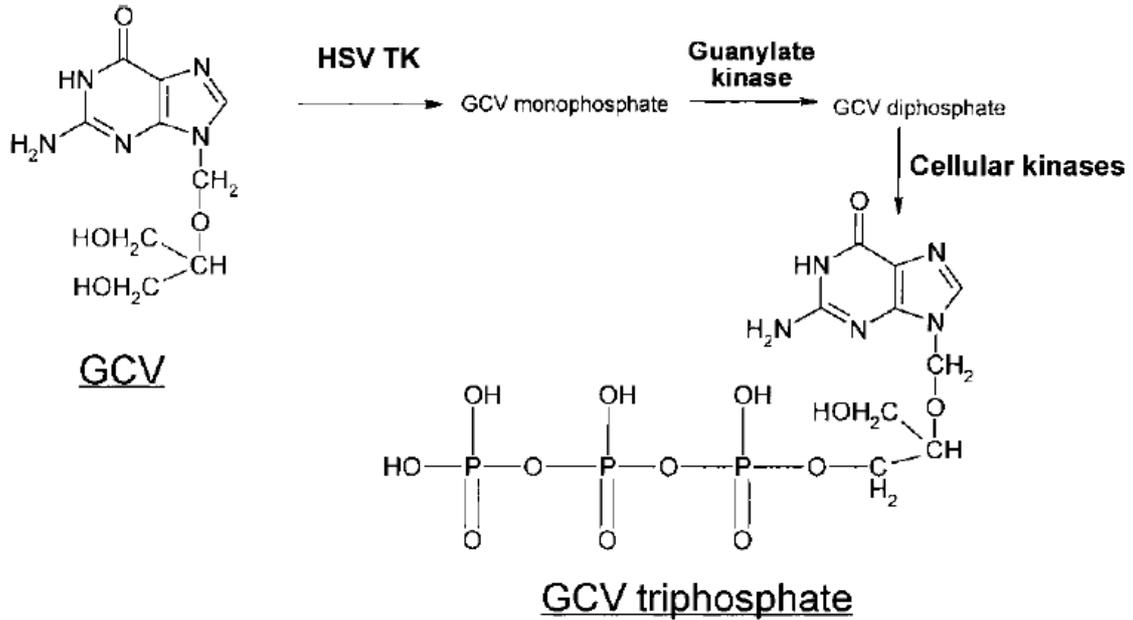


Figure 16 : Métabolisme d'activation du ganciclovir

(D'après Greco et al., 2001)

Le ganciclovir (GCV) est métabolisé en GCV monophosphate à l'aide de la thymidine kinase (HSV-tk). Celui-ci sera ensuite phosphorylé en GCV triphosphate à l'aide de kinases intracellulaires. Le GCV triphosphate aura une activité antitumorale de par son action d'analogue nucléosidique. {Greco, 2001 #148}

cytotoxiques et d'en diminuer la toxicité systémique notamment au niveau des organes sains. Elle a été développée pour le traitement de diverses tumeurs solides.

Cette technique peut se décomposer en deux étapes :

1^{ère} étape : transfert du gène suicide (enzyme) dans la tumeur

2^{ème} étape : administration par voie systémique ou intratumorale

de la prodrogue qui sera métabolisée dans la tumeur par l'enzyme.

Lors du transfert de gènes, peu de cellules tumorales exprimeront l'enzyme. Cependant pour permettre la meilleure efficacité possible, on peut compter sur un effet de voisinage appelé « effet *bystander* ». Il consiste au passage de métabolites cytotoxiques d'une cellule à l'autre par diffusion passive ou via les jonctions communicantes (*gap junction*). Cet effet permet aux cellules non transduites d'être également détruites.

III.2 LES DIFFÉRENTES COMBINAISONS GÈNES SUICIDES – PRODROGUES

III.2.1 THYMIDINE KINASE – GANCICLOVIR

Historiquement, il s'agit de la première enzyme utilisée dans une stratégie de GDEPT. Le gène de la thymidine kinase est issu du virus de l'herpès *simplex* (HSV-tk) et est associé à une prodrogue antivirale telle que l'Acyclovir (Zovirax[®]) ou le Ganciclovir (Cymevan[®]) (**figure 16**). Le Ganciclovir ayant une meilleure affinité pour la thymidine kinase que l'Acyclovir, il est devenu la prodrogue la plus utilisée avec HSV-tk. Ainsi, la thymidine kinase va phosphoryler le Ganciclovir pour donner un composé monophosphate. Par la suite des kinases intracellulaires vont de nouveau phosphoryler le composé

monophosphate pour aboutir au Ganciclovir triphosphate qui va se comporter comme un analogue nucléosidique et s'insérer dans le double brin d'ADN. Cela entraînera l'inhibition de l'ADN polymérase lors de la réplication.

L'efficacité de la stratégie HSV-tk/GCV a été démontrée dans de nombreux modèles murins de carcinomes *in vivo* incluant des hépatocarcinomes, des adénocarcinomes du colon, et des gliomes (Maatta et al., 2009) (Misumi et al., 2003) (Fillat et al., 2003).

L'avantage de l'enzyme HSV-tk est qu'elle a une activité 1000 fois plus importante pour le métabolisme du ganciclovir que les thymidine kinase cytosoliques humaines. Mais le principal inconvénient vient du fait que la thymidine kinase de HSV possède une affinité 100 fois plus importante pour la thymidine que pour le ganciclovir ; K_m de 0.5 μM pour la thymidine contre 47 μM pour le GCV (Black, 2001). Cette compétition avec un substrat endogène représente une limitation, et diminue l'efficacité de la stratégie.

Pour pallier la moins bonne affinité de la thymidine kinase pour le GCV, des mutants de l'enzyme ont été développés (Ardiani et al., 2010) (Preuss et al., 2010) (Preuss et al., 2011).

Une des autres limitations de la thymidine kinase et ganciclovir réside dans la diffusion des métabolites du ganciclovir. En effet, le ganciclovir est phosphorylé pour donner des analogues nucléosidiques. Or, les molécules phosphorylées ne diffusent pas librement entre les cellules car les groupements phosphorylés empêchent le passage de la bicouche lipidique membranaire (Cottin et al., 2010). Pour pouvoir passer d'une cellule à l'autre, les molécules doivent passer via des jonctions communicantes dont l'expression est diminuée dans les cellules tumorales, ce qui pourrait *in fine* limiter l'efficacité de la thérapeutique (Pointis et al., 2007) (Cronier et al., 2009).

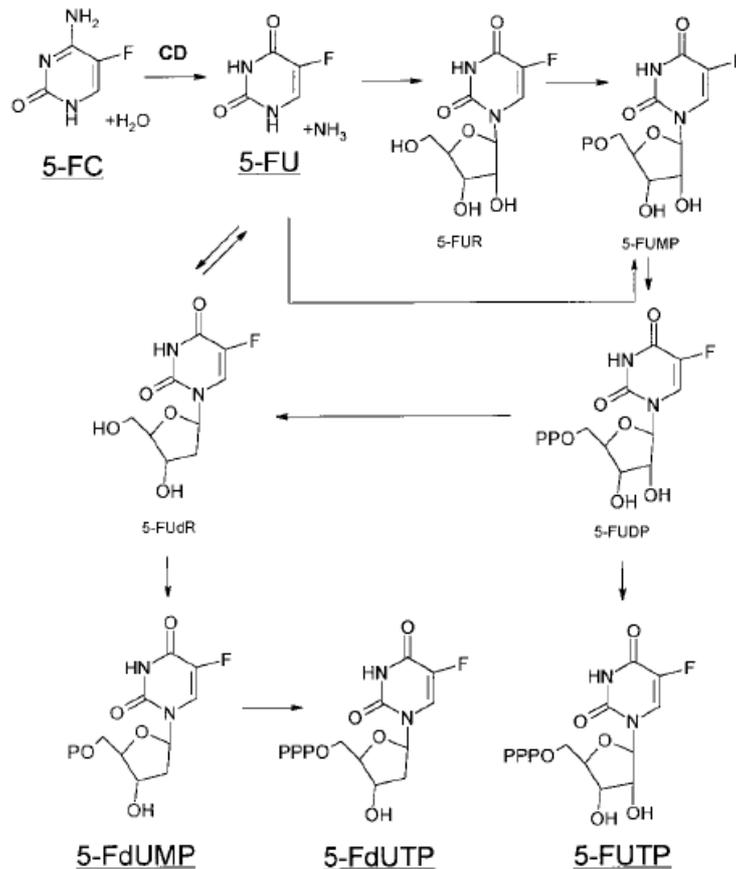


Figure 17 : Métabolisme de la 5-Fluorocytosine

(D'après Greco et al., 2001)

La 5-Fluorocytosine est métabolisée en 5-Fluorouracile (5-FU) par l'intermédiaire de la cytosine désaminase. *In vivo*, le 5-FU est converti en 5-Fluorodésoxyuridine-5' monophosphate (5FdUMP), puis en 5-fluorodésoxy-5' triphosphate (5-FdUTP) et en 5-fluorouridine triphosphate (5-FUTP) par une phosphoribosyltransférase puis par des kinases, qui auront une action cytotoxique sur les cellules. Une autre voie, plus longue, faisant intervenir des intermédiaires du 5-FUTP que sont 5-FUMP (5 fluorouridine 5'monophosphate), 5-FUDP (5-fluorouridine 5'diphosphate) qui sont phosphorylés par des kinases intracellulaires.

***ESSAIS CLINIQUES**

De nombreux essais cliniques utilisant HSV-tk ont été réalisés. Il s'agit, à l'heure actuelle, du seul gène suicide ayant été mené jusqu'en phase III (Rainov, 2000) (Westphal et al., 2013). Ces essais cliniques font suite aux études pré-cliniques et ont concerné principalement les glioblastomes lors des premiers essais pour cette GDEPT (Immonen et al., 2004) (Barzon et al., 2009) (Germano et al., 2003) (Shand et al., 1999) (Prados et al., 2003) (Trask et al., 2000) (Klatzmann et al., 1998b). Les premiers vecteurs utilisés ont été des vecteurs rétroviraux (Klatzmann et al., 1998a) (Singh et al., 2001), par la suite de nombreux essais ont été développés en utilisant des vecteurs adénoviraux (Kim et al., 2012) (Sangro et al., 2010) (Xu et al., 2009) (Nasu et al., 2007) (Serman et al., 2005) (Ayala et al., 2006) (**tableau 2**).

Ces essais ont connu des résultats mitigés ne permettant pas de retrouver les résultats encourageants obtenus sur des modèles pré-cliniques. (Schwarzenberger et al., 2011) (Serman et al., 1998) (Chevez-Barrios et al., 2005)

III.2.2 CYTOSINE DÉSAMINASE – 5-FLUOROCYTOSINE

La cytosine désaminase (CD) est une enzyme présente dans les bactéries (*Escherichia Coli*), les champignons (*Aspergillus Fumigatus*) et les levures (*Saccharomyces Cerevisiae*) qui permet, comme son nom l'indique, la désamination d'une cytosine en uracile. Cette enzyme n'est pas exprimée dans les cellules mammifères ce qui en fait une bonne cible pour des antifongiques (Porter and Austin, 1993) ; parmi lesquels le 5-Fluorocytosine (5-FC) (Ancotil[®]). En présence de la CD, elle sera métabolisée en 5-Fluorouracile (5-FU), un analogue nucléotidique des bases pyrimidiques (**figure 17**). C'est la production de 5-FU par l'enzyme qui a donné l'idée de développer cette GDEPT. Le 5-

	Localisation	Vecteur	Année	Références
PHASE I	Utérus	Adénovirus	2012	Kim et al.
	Mésothélium	Cellules	2011	Schwazenberger et al.
	Foie	Adénovirus	2010	Sangro et al.
	Cerveau	Rétrovirus	2009	Barzon et al.
	ORL	Adénovirus	2009	Xu et al.
	Prostate	Adénovirus	2007	Nasu et al.
	Mésothélium	Adénovirus	1998	Sterman et al.
	Œil	Adénovirus	2005	Chevez-Barríos et al.
	Cerveau	Adénovirus	2004	Immonen et al.
	Cerveau	Adénovirus	2003	Germano et al.
	Peau, Sein, Poumon	Rétrovirus	2001	Singh et al.
	Cerveau	Adénovirus	2000	Trask et al.
PHASE II	Prostate	Adénovirus	2006	Ayala et al.
	Cerveau	Rétrovirus	1999	Shand et al.
	Cerveau	Vector Producing Cells	2003	Prados et al.
	Cerveau	Rétrovirus	1998	Klatzmann et al.
	Peau	Rétrovirus	1998	Klatzmann et al.
PHASE III	Cerveau	Rétrovirus	2000	Reinov et al.

Tableau 2 : Résumé des principaux essais cliniques réalisés utilisant HSV-tk /

Ganciclovir

La grande majorité des essais cliniques réalisés concernent des essais de phase I. A ce jour seul un essai de phase III a été réalisé dans les années 2000.

FU est un médicament classiquement administré dans différentes chimiothérapies anticancéreuses mais qui présente d'importantes toxicités, notamment du fait des doses importantes à administrer. L'utilisation d'une prodrogue, la 5-FC, métabolisée *in situ* dans la tumeur permet d'augmenter la concentration de métabolites toxiques tout en limitant les toxicités systémiques.

Le 5-FU exerce sa cytotoxicité essentiellement après sa conversion en 5-FU monophosphate (5-FUMP) par des enzymes intracellulaires puis sous la forme désoxy, 5-dFUMP, qui jouera le rôle d'antimétabolite en liant de façon irréversible à la thymidilate synthase provoquant l'arrêt de la synthèse d'ADN puis la mort de la cellule.

Un des inconvénients dans l'utilisation de cette enzyme est la présence de bactéries intestinales exprimant la cytosine désaminase et étant donc capables de métaboliser le 5-FC, ce qui peut être la cause de toxicités qui peuvent se manifester par des complications gastro-intestinales ou des effets sur la moelle osseuse.

De plus, l'affinité de la cytosine désaminase bactérienne pour le 5-FC est plus faible comparée à la cytosine endogène, ce qui oblige à administrer des doses de 5-FC très importantes pour avoir un effet antitumoral mais entraîne par conséquent de graves toxicités.

***ESSAIS CLINIQUES**

A l'image de toutes les enzymes utilisées en GDEPT, les essais cliniques menés avec la cytosine désaminase concernent principalement des essais de phase I.

Un premier essai de phase I, a été mené sur 12 patientes atteintes de cancer du sein par l'équipe de Pandha et al. (Pandha et al., 1999) Le gène de la cytosine désaminase a été

vectorisé dans un plasmide sous le contrôle du promoteur erbB2, connu pour être surexprimé dans les cancers du sein. Les patientes ont reçu le plasmide par injection intratumorale, puis 48 heures plus tard, le traitement au 5-FC par infusion. Les résultats ont pu montrer la faisabilité de la technique avec une expression de la cytosine désaminase dans plus de 90% des tumeurs des patientes.

Crystal et al., (Crystal et al., 1997) après avoir montré l'efficacité de cette combinaison CD/5-FC sur des modèles pré-cliniques, ont établi un protocole de transfert du gène de la cytosine désaminase par un vecteur adénoviral. 18 patients, atteints de cancer colorectaux, inclus dans l'étude ont été divisés en trois groupes de 6 patients, différant par la dose de vecteur adénoviral administrée.

La cytosine désaminase a aussi été vectorisée dans des bactéries avec l'utilisation d'une souche de *Salmonella Typhimurium*. Une première étude de phase I a été menée pour démontrer l'innocuité de l'administration du vecteur intratumorale ou intraveineuse. Pour cela 45 patients ont été enrôlés dans ce protocole. Les résultats obtenus montrent la bonne tolérance après l'administration du vecteur quelque soit la voie utilisée (Cunningham and Nemunaitis, 2001). Après les résultats concluants obtenus dans la faisabilité, la même équipe s'est lancée dans le recrutement de patients afin d'associer le 5-FC au vecteur (Nemunaitis et al., 2003).

III.2.3 DÉSOXYCYTIDINE KINASE – GEMCITABINE

La désoxycytidine kinase (DCK) est une enzyme humaine impliquée dans la phosphorylation des désoxyribonucléosides, particulièrement la désoxycytidine et à l'exception de la thymidine. Elle joue donc un rôle important dans la synthèse d'ADN en permettant la production de désoxyribonucléotides phosphates.

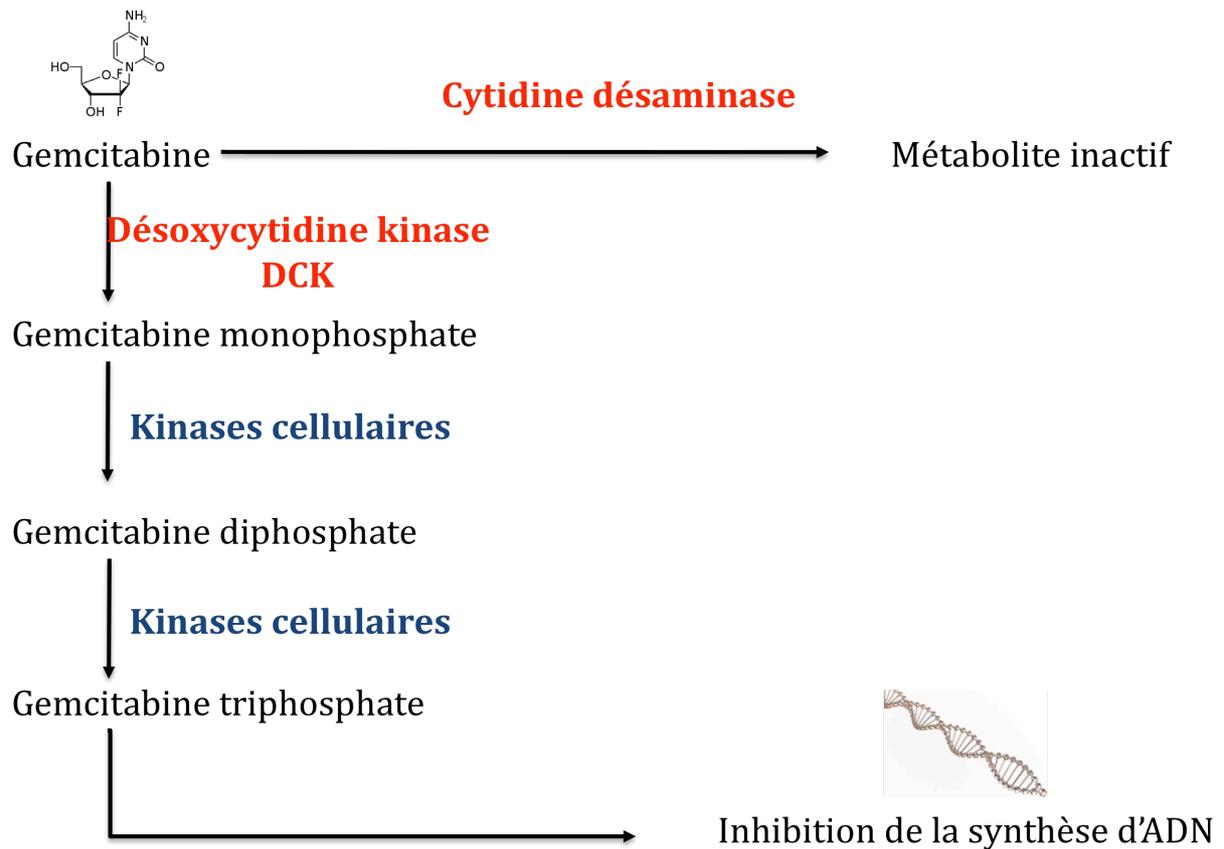


Figure 18 : Voies métaboliques de la gemcitabine

La gemcitabine est activée en gemcitabine triphosphate par une cascade de phosphorylations impliquant en premier lieu la désoxycytidine kinase qui donnera la gemcitabine monophosphate. Des kinases cellulaires interviendront ensuite pour phosphoryler de nouveaux la gemcitabine pour aboutir à la gemcitabine triphosphate, analogue nucléosidique intervenant dans l'inhibition de la synthèse d'ADN. Il existe une voie de détoxication de la gemcitabine en métabolite inactif par l'intermédiaire de la cytidine désaminase.

D'un point de vue pharmacologique, elle intervient dans le métabolisme de la Gemcitabine.

La Gemcitabine (Gemzar[®]), ou 2'-désoxy-2',2'-difluorocytidine, est un analogue nucléosidique de la désoxycytidine. Il s'agit d'une prodrogue qui nécessite d'être métabolisée par la DCK pour donner un composé actif sous forme phosphorylée (**figure 18**). De par ses caractéristiques d'analogues nucléosidiques, les métabolites de la gemcitabine auront des effets sur les enzymes impliquées dans la synthèse et la réparation de l'ADN. Ils pourront, de plus, s'incorporer dans la double hélice d'ADN à la place de la désoxycytidine triphosphate (dCTP) endogène, inhibant la synthèse de l'ADN.

La DCK va intervenir en premier dans la cascade de phosphorylation de la gemcitabine, permettant d'obtenir un composé monophosphate, puis des kinases intracellulaires vont phosphoryler ce dernier jusqu'à obtenir une forme triphosphate. Le fait que la DCK soit la première enzyme de cette cascade en fait un facteur limitant dans l'activation de la gemcitabine et donc dans le succès du traitement. Afin d'améliorer la phosphorylation de la prodrogue, la DCK est associée dans un gène de fusion avec l'Uridine Monophosphate Kinase (UMK). L'UMK intervient dans la phosphorylation d'analogues nucléosidiques ; la co-expression de la DCK et de l'UMK permet ainsi d'améliorer l'activation de la gemcitabine et *in fine* l'efficacité du traitement (Galmarini et al., 2002) (Vernejoul et al., 2006).

La gemcitabine est administrée dans les adénocarcinomes du pancréas localement avancés ou métastatiques, mais aussi dans les cancers du poumon non à petites cellules en première ligne, les cancers de la vessie et en association dans certains cancers du sein, de l'ovaire.

L'association désoxycytidine kinase – Gemcitabine présente l'avantage d'améliorer l'efficacité de métabolisation dans la tumeur, mais aussi de contrebalancer les différences de métabolisme d'un patient à un autre (van Haperen et al., 1996).

Cette nouvelle stratégie commence à être développée en clinique, notamment dans les cancers du pancréas.

***ESSAIS CLINIQUES**

L'équipe du Professeur Louis Buscail à Toulouse (UMR 1037), a mis au point un protocole incluant des patients atteints de cancer du pancréas. Ce travail se base sur des études précliniques ayant montré des résultats encourageants sur des lignées pancréatiques (Vernejoul et al., 2006). Dans ce travail un gène de fusion combinant la DCK et l'uridine monophosphate kinase (UMK) est utilisé pour convertir la gemcitabine en métabolites phosphorylés cytotoxiques. Dans ce protocole, 22 patients ont été inclus dans cet essai : 12 en première ligne de traitement et les 10 autres en seconde ligne de traitement. Le gène de fusion DCK :: UMK est administré sous forme plasmidique directement dans la tumeur, sous endoscopie. 4 doses différentes s'échelonnant de 125 à 1000 µg d'ADN ont été administrées 2 fois aux patients (jour 1 et jour 28). La gemcitabine est donnée en même temps et durant 2 mois. Les résultats obtenus sur la faisabilité de la technique montrent que tous les patients inclus ont pu être injectés malgré les difficultés anatomiques dues à la localisation des tumeurs. Chez les patients ayant été traités en première ligne, 2 ont eu une diminution de la taille des tumeurs et 9 ont eu une stabilisation du volume tumoral, et seul un patient a vu une progression du volume tumoral. Sur l'ensemble des patients traités, 68% ont vu une diminution du CA 19.9 (Carbohydre antigen 19.9), un marqueur spécifique des carcinomes pancréatiques, montrant une bonne évolution du traitement. Dans tous les cas, cet essai a permis de montrer la faisabilité de la technique et des effets

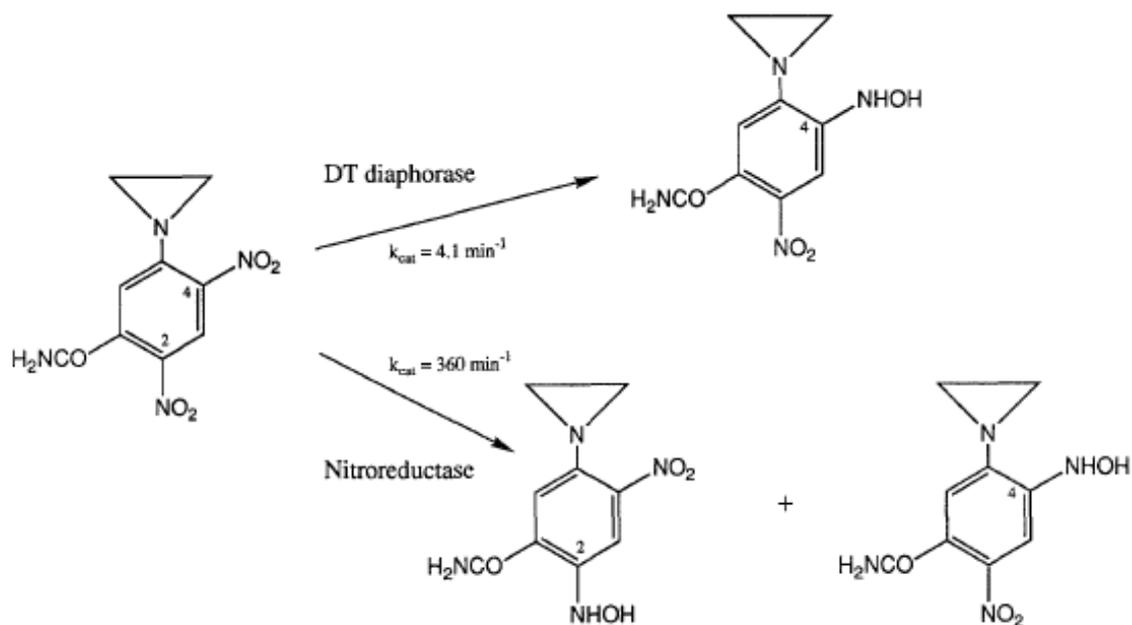


Figure 19 : Métabolisme du CB 1954

(D'après Knox et al., 1993)

Le composé CB1954 est métabolisé par la DT diaphorase ou la nitroréductase. La diaphorase permet la production de 5-(aziridin-1-yl)-4 hydroxylamino-2-nitrobenzamide tandis que la nitroréductase permet la production équimolaire des formes 2 et 4-hydroxylamino, parmi lesquelles la forme 4-hydroxylamino possède la plus activité cytotoxique.

D'un point de vue cinétique, les constantes catalytiques (K_{cat}) de la DT diaphorase et de la nitroréductase sont respectivement de $4,1 \text{ min}^{-1}$ et 360 min^{-1} .

bénéfiques du traitement sur la progression tumorale. La survie après traitement a augmenté de quelques mois pour les patients ayant reçu cette thérapie génique par rapport aux autres patients. Une étude de phase II est actuellement en cours de préparation afin de confirmer les résultats thérapeutiques obtenus.

III.2.4 NITRORÉDUCTASE – CB1954

CB1954 (5-(azirin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide) est une prodrogue activée par la nitroréductase en un mélange équimolaire des formes 2 et 4-hydroxylamino des métabolites cytotoxiques (**figure 19**), parmi lesquels la forme 4-hydroxylamino possède le plus fort pouvoir antitumoral. Cette importante activité antitumorale du CB1954 a été montrée pour la première fois sur des lignées de carcinome de rat (Walker 256 rat carcinoma) (Roberts et al., 1986). Dans ces lignées, il a pu être mis en évidence la conversion de cette prodrogue en métabolites avec un pouvoir cytotoxique élevé (Knox et al., 1988) grâce à la métabolisation par la DT-diaphorase endogène présente dans ces lignées. Cependant, cette prodrogue s'avère être peu efficace sur des lignées tumorales humaines ; ceci s'explique par la faible affinité de CB1954 pour la DT-diaphorase humaine (Boland et al., 1991). Des études ont montré que la nitroréductase d'*Escherichia Coli* peut métaboliser de manière 100 fois plus efficace le CB1954 que la DT-diaphorase humaine (Knox et al., 1992) et 60 fois plus que la DT-diaphorase de rat (Anlezark et al., 1992) (Michael et al., 1994). L'avantage de cette prodrogue est qu'elle agit, contrairement à d'autres, indépendamment du cycle cellulaire.

A la vue de ces propriétés, il a été émis l'idée de développer une stratégie gène suicide en combinant le gène de la nitroréductase bactérienne et le traitement CB1954.

***ESSAIS CLINIQUES**

Peu d'essais cliniques ont été menés avec cette enzyme et les seuls menés ont principalement été des essais de phases I ou II. Pour chacun de ces essais le transfert a été effectué grâce à un vecteur adénoviral non-répliquatif. En 2004, Palmer et al. ont inclus 18 patients atteints de tumeurs hépatiques dans leur protocole. Le gène de la nitroréductase bactérienne a été transféré à l'aide d'un vecteur adénoviral recombinant 3 à 8 jours avant une chirurgie de résection. Le but étant de montrer l'innocuité du vecteur (Phase I), les patients n'ont pas reçu de CB1954. Les résultats montrent qu'une injection directe intratumorale entraîne une expression importante de nitroréductase dans les tumeurs (Palmer et al., 2004). Un autre essai de phase I/II a été mené sur des cancers de la prostate en utilisant des adénovirus recombinants (Patel et al., 2009). 39 patients ont été inclus répartis dans 3 groupes : un groupe ne recevant que le vecteur, un groupe recevant le vecteur à une dose fixe et la prodrogue et un groupe recevant le vecteur en doses croissantes et la prodrogue. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence une bonne expression de l'enzyme dans les tumeurs et chez les patients traités une amélioration des marqueurs biologiques pouvant aller jusqu'à une diminution de la taille des tumeurs. De plus la tolérance au traitement est bonne malgré l'induction d'une réponse immunitaire dirigée contre les adénovirus. Un essai de phase III est envisagé pour confirmer l'intérêt de cette combinaison.

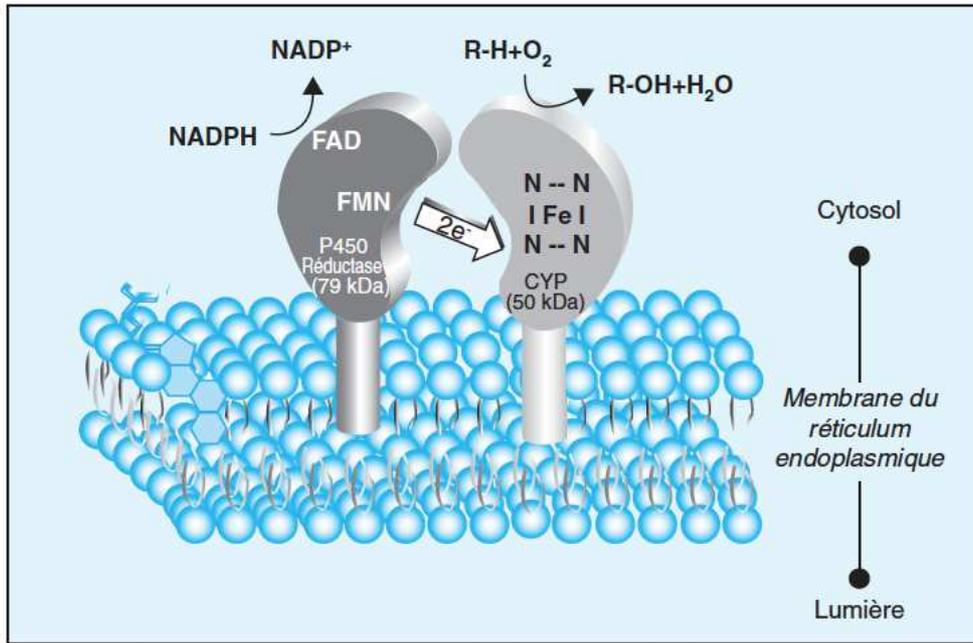


Figure 20 : Représentation schématique d'un cytochrome P450 associé à la NADPH cytochrome P450 réductase, ancrés dans la membrane du réticulum endoplasmique

(D'après Gueguen et al., 2006)

Le cytochrome P450 (CYP) et la NADPH cytochrome P450 réductase (RED) sont ancrés dans la membrane du réticulum endoplasmique sur la face cytosolique. Le CYP est une mono-oxygénase, il va participer aux réactions d'oxygénations de xénobiotiques. La RED va participer au transfert d'électrons vers le CYP.

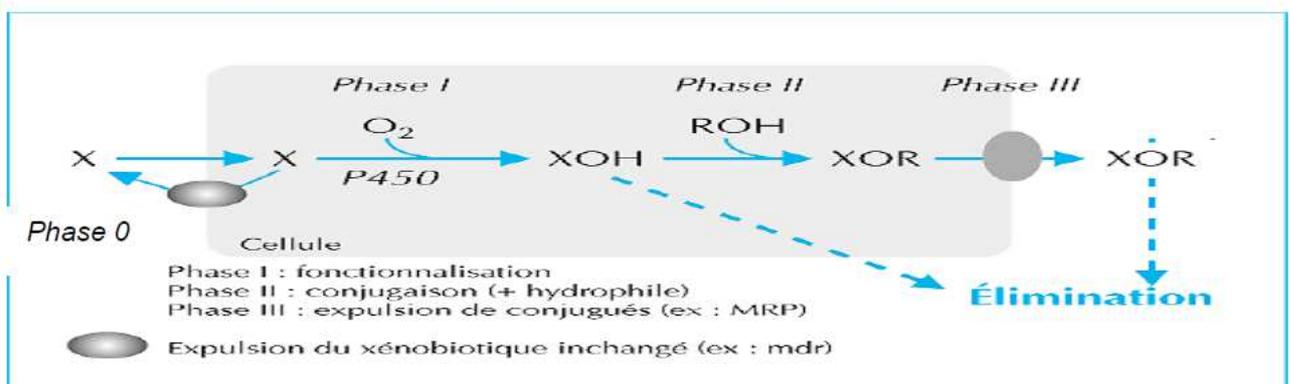


Figure 21 : Métabolisme des xénobiotiques

(D'après Beaune et al., 1999)

III.2.5 LES CYTOCHROMES P450

Ce travail de thèse ayant pour sujet le métabolisme du cyclophosphamide par le cytochrome P450 2B6, ces enzymes, et leur implication dans le métabolisme des xénobiotiques sont particulièrement détaillées dans ce paragraphe.

Les cytochromes P450 (CYP) sont des enzymes intervenant principalement dans le métabolisme des xénobiotiques (molécules hydrophobes exogènes de faible poids moléculaire tel que des médicaments, polluants, pesticides...) (**figure 20**). Les molécules hydrophobes ont la capacité de traverser les membranes cellulaires et peuvent ainsi être toxiques pour la cellule. C'est pourquoi il est important d'avoir un système enzymatique capable de métaboliser les xénobiotiques et de les rendre plus hydrophiles, pour une élimination plus facile *via* les fluides corporels. Cependant, certaines molécules métabolisées peuvent devenir source de toxicité du fait de la production de métabolites réactifs électrophiles capables d'alkyler des protéines cellulaires de l'ADN.

Les CYP se localisent principalement dans le foie mais on en retrouve aussi dans les organes au contact du milieu extérieur (poumon, intestin par exemple), ou des organes ayant un important débit sanguin (rein par exemple).

Dans le métabolisme des xénobiotiques, qui se déroule en 3 phases (**figure 21**), les CYP sont dites enzymes de phase I ou enzymes de fonctionnalisation.

Chez l'Homme, il existe plusieurs familles et sous-familles de cytochrome P450 (CYP) issus de 57 gènes différents (<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>). (Nelson, 2009) Une nomenclature a été mise en place, basée sur un système de chiffres et de lettres permettant de regrouper les CYP en familles et sous-familles en fonction de leur degré d'homologie de séquence en acides aminés. (Nelson, 2006) Ainsi, deux CYP de la même

famille auront le même chiffre ; s'ils sont de la même sous-famille, ils auront leur chiffre et lettre en commun, le dernier chiffre étant spécifique de l'isoforme.

Par exemple :

Les CYP **1A**, **1B** appartiennent à la même famille

Les CYP **1A1**, **1A2** appartiennent à la même sous-famille.

Deux CYP sont de la même famille si leur homologie de séquence en acides aminés est supérieure à 40%, et de la même sous-famille pour une homologie de séquence supérieure à 55%. (Nelson et al., 1993) L'expression des différentes familles et sous-familles varie dans chaque tissu. Ainsi un CYP, peut être exprimé dans un organe et pas dans un autre. En plus de cela, on peut mettre en évidence des variations interindividuelles : par exemple l'expression du CYP2B6 dans le foie peut varier de 20 à 250 fois entre deux individus (Stresser and Kupfer, 1999) Ce système multienzymatique est composé d'une mono-oxygénase et d'une NADPH Cytochrome P450 réductase (RED). Les principales réactions catalysées par les CYP sont des mono-oxygénations avec principalement des hydroxylations et des époxydations (Mansuy, 2011), il est donc nécessaire d'apporter des électrons au CYP qui seront fournis par le NADPH.

Le CYP est une hémoprotéine dont le fer va jouer un rôle central dans la fixation de l'oxygène : la sixième position de coordination du fer étant libre, c'est elle qui va permettre la fixation d'une molécule de dioxygène au cours du cycle catalytique. La RED est composée de deux domaines contenant chacun une flavine, elle intervient dans le transfert des électrons indispensables au métabolisme des substrats.

Schématiquement, on peut représenter les cytochromes P450 comme des hémoprotéines constituées d'une chaîne polypeptidique : l'apoprotéine ; et d'un

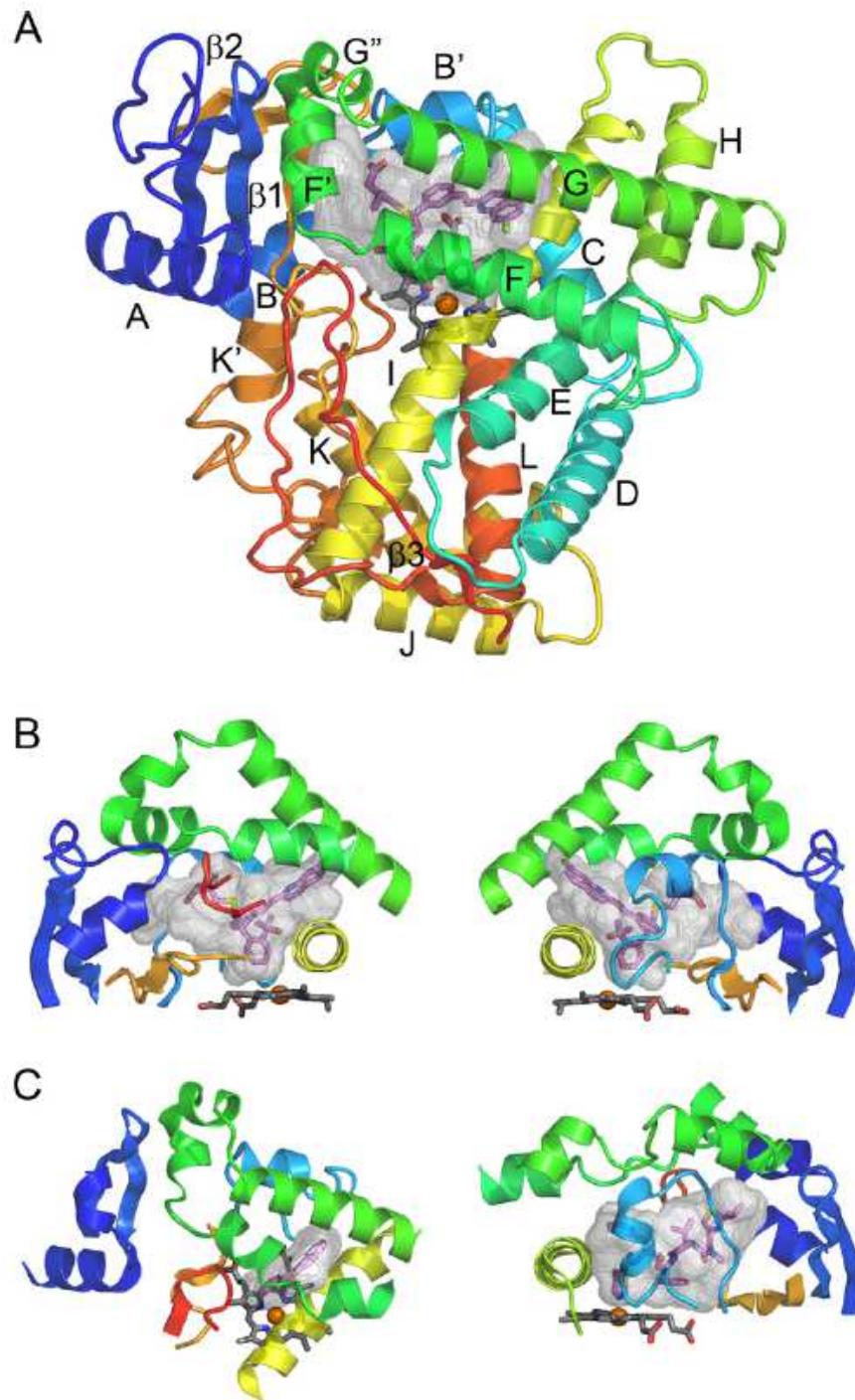


Figure 22 : Représentation schématique des feuillets et hélices d'un CYP
 (D'après Gay et al., 2010)

groupement prosthétique central : l'hème qui sera le catalyseur de la réaction enzymatique (**figure 20**). L'apoprotéine et l'hème sont liés de façon non covalente par l'intermédiaire d'une cystéine.

D'un point de vue structural, les CYP sont constitués d'environ 500 acides aminés formant 16 à 18 hélices alpha, notées de A à L, et 4 à 6 feuillets bêta, numérotés de 1 à 6 (**figure 22**). La région N-terminale est riche en acides aminés hydrophobes permettant l'ancrage de la protéine dans les membranes du réticulum endoplasmique, suivie d'un motif conservé riche en proline et comprenant des résidus chargés positivement (interaction avec les têtes polaires des phospholipides membranaires) (Johnson and Stout, 2013).

Le site actif de tous les CYP, constitué d'une cavité hydrophobe, est connecté à l'environnement extérieur grâce à des canaux qui permettent le passage des substrats, des produits de l'enzyme ainsi que de molécules d'eau nécessaires à la réaction enzymatique.

Il est délimité par les hélices F, G et I, la boucle B-C, la boucle C-terminale et la boucle située après l'hélice K (**figure 22**).

A l'image des CYP, la NADPH cytochrome P450 réductase est ancrée à la membrane par une hélice transmembranaire dans la partie N-terminale. Elle est composée de quatre domaines structuraux caractéristiques : un domaine N-terminal comprenant un cofacteur FMN, un domaine de liaison au CYP, un domaine à flavine FAD et un domaine C-terminal de liaison au NADPH.

Pour que les cytochromes P450 puissent fonctionner correctement et métaboliser les substrats, ils ont besoin d'électrons. Ces électrons sont apportés par la NADPH P450 Réductase et son co-facteur le NADPH. L'association de ces deux enzymes est essentielle au bon fonctionnement du CYP.

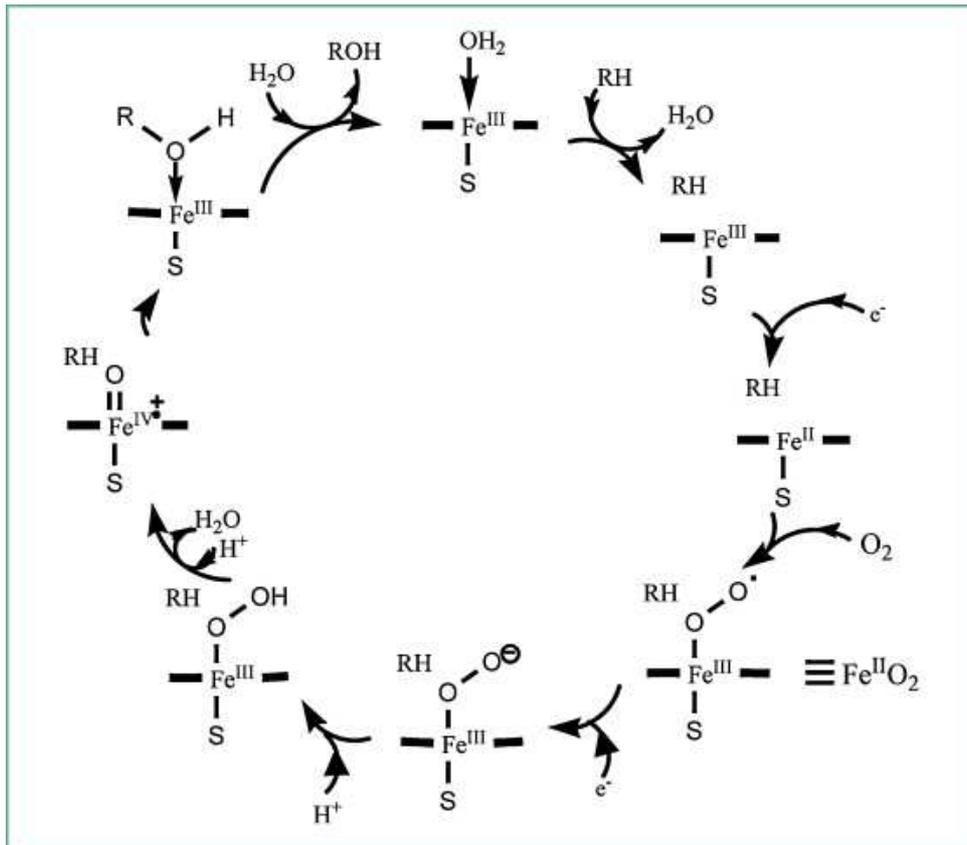


Figure 23 : Cycle catalytique du Cytochrome P450.

(D'après Mansuy et al., 2011)

Le cycle catalytique du CYP implique le transfert d'électron et de molécules d'oxygène au substrat. A l'état de repos, le fer du cytochrome P450 est sous forme Fe(III)

Le cycle débute par l'interaction du substrat avec le site actif du CYP qui induit une modification de la conformation et un changement d'état de spin du fer de l'hème. Ce dernier, par transfert d'électrons, va passer d'un état de fer ferrique à fer ferreux. Dans cet état réduit, il y a fixation d'une molécule de dioxygène qui réagit avec le fer. Un deuxième électron est ensuite transféré conduisant à la formation d'un ligand peroxy. Celui-ci est protoné deux fois libérant une molécule d'eau. Par la suite, le substrat est hydroxylé puis libéré. L'enzyme revient alors à son état initial par coordination d'une molécule d'eau occupant cette position distale de l'ion Fe(III) de l'hème.

Le cycle catalytique des CYP conduisant à l'oxydation d'un substrat se déroule en trois grandes étapes : fixation du substrat, fixation et activation d'oxygène et oxydation du substrat qui quitte alors le site actif du CYP (**figure 23**).

Dans le détail, le CYP va utiliser une molécule de dioxygène qu'il va transférer au substrat et à une molécule d'eau (chacun fixant un atome d'oxygène). Pour réaliser ces transferts, le CYP utilise des électrons qui vont réduire le fer de l'hème, permettant la fixation de l'oxygène moléculaire, qui lui sont apportés par le NADPH au cours du cycle catalytique de l'enzyme. La fixation et le transfert de l'oxygène nécessitent l'apport de 2 électrons. Ce transfert n'est pas possible en une seule étape ; la NADPH P450 réductase va permettre le transfert des électrons du NADPH un par un. Le premier électron va permettre la fixation d'une molécule d'O₂ sur le fer à l'état Fe²⁺. Le deuxième électron va entraîner la formation d'un complexe peroxoferrique qui suite à l'apport de protons va libérer une molécule d'eau. Un atome d'oxygène est ensuite transféré au substrat ce qui termine le cycle, l'enzyme revient à son état initial et est de nouveau prête à métaboliser un substrat.

L'une des caractéristiques des CYP est la grande variabilité de substrats qu'ils peuvent métaboliser. Ils sont capables de catalyser une large variété de réactions régio et stéréospécifiques sur une large gamme de substrats. La spécificité de substrat des CYP est dite « floue » ou relative et chevauchante (Beaune, 1993). Une même molécule peut être métabolisée par plusieurs cytochromes P450 et plusieurs molécules différentes peuvent être métabolisées par un même CYP. Ainsi, un même CYP peut métaboliser des substrats de poids moléculaire et de nature chimique différents. Par exemple, le CYP3A4 est capable de métaboliser le paracétamol dont le poids moléculaire est de 151 daltons, mais aussi la cyclosporine beaucoup plus volumineuse avec un poids moléculaire de 1200 daltons (**figure 24**) (Rendic, 2002).

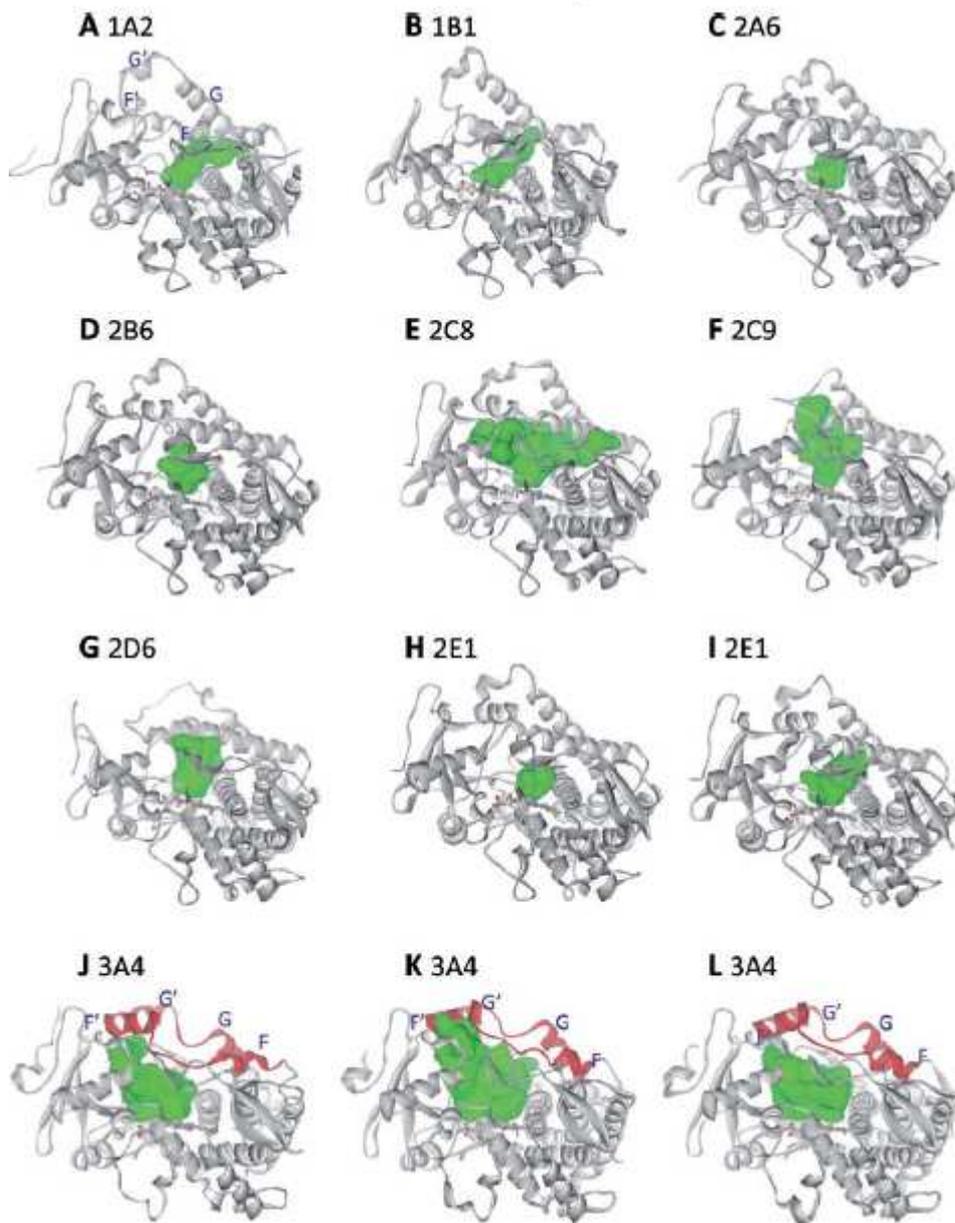


Figure 24 : Structures cristallisées des principaux CYP

(D'après Dong et al., 2012)

En vert : le site actif des cytochromes P450.

La variabilité des sites actifs entre les différents cytochromes P450 est le reflet de la variabilité des substrats métabolisés par les CYP. Les structures cristallisées mettent en évidence les zones conservées entre les différentes isoformes de CYP.

Parmi l'ensemble des CYP, le CYP3A4 est impliqué dans le métabolisme d'environ 35% des médicaments et trois des principaux CYP (3A4, 2C9, 2D6) métabolisent plus de 80% des médicaments (Rendic, 2002) (McGraw and Waller, 2012).

Des polymorphismes d'expression de CYP vont entraîner des variations de leurs activités catalytiques (**Annexe II**). A partir de ces polymorphismes on peut établir différents phénotypes : « métaboliseurs lents, intermédiaires ou rapides ». D'un point de vue pharmacologique, les métaboliseurs rapides éliminent plus rapidement les médicaments administrés, alors que les métaboliseurs lents les dégradent plus lentement avec un risque de toxicité en cas d'accumulation excessive pour certains médicaments, (McGraw and Waller, 2012) ou à l'inverse, s'il s'agit de prodrogues, les métaboliseurs rapides l'activeront rapidement avec un effet rapide en revanche pour les métaboliseurs lents, l'activation prendra du temps et l'effet thérapeutique ne sera pas immédiat. Pour ces raisons, des ajustements de traitements peuvent être réalisées pour optimiser l'efficacité thérapeutique.

L'expression des gènes des CYP est fortement régulée : de nombreux xénobiotiques (dioxine, pesticides, médicaments...) ou ligands endogènes vont agir comme inducteurs ou répresseurs de l'expression. La plupart de ces xénobiotiques vont moduler l'activité transcriptionnelle de certains récepteurs nucléaires (AhR, PXR, CAR) ayant pour cibles les promoteurs des CYP. Ces mêmes récepteurs nucléaires peuvent également réguler l'expression de certains transporteurs membranaires impliqués dans des phénomènes de détoxification de la cellule, et dans le cas de certains médicaments aboutir à une moindre efficacité thérapeutique (Smutny et al., 2013).

L'étude du métabolisme des médicaments a permis de mettre en évidence un certain nombre de prodrogues activées par les cytochromes P450, et permettent notamment aujourd'hui de développer de nouvelles applications thérapeutiques.

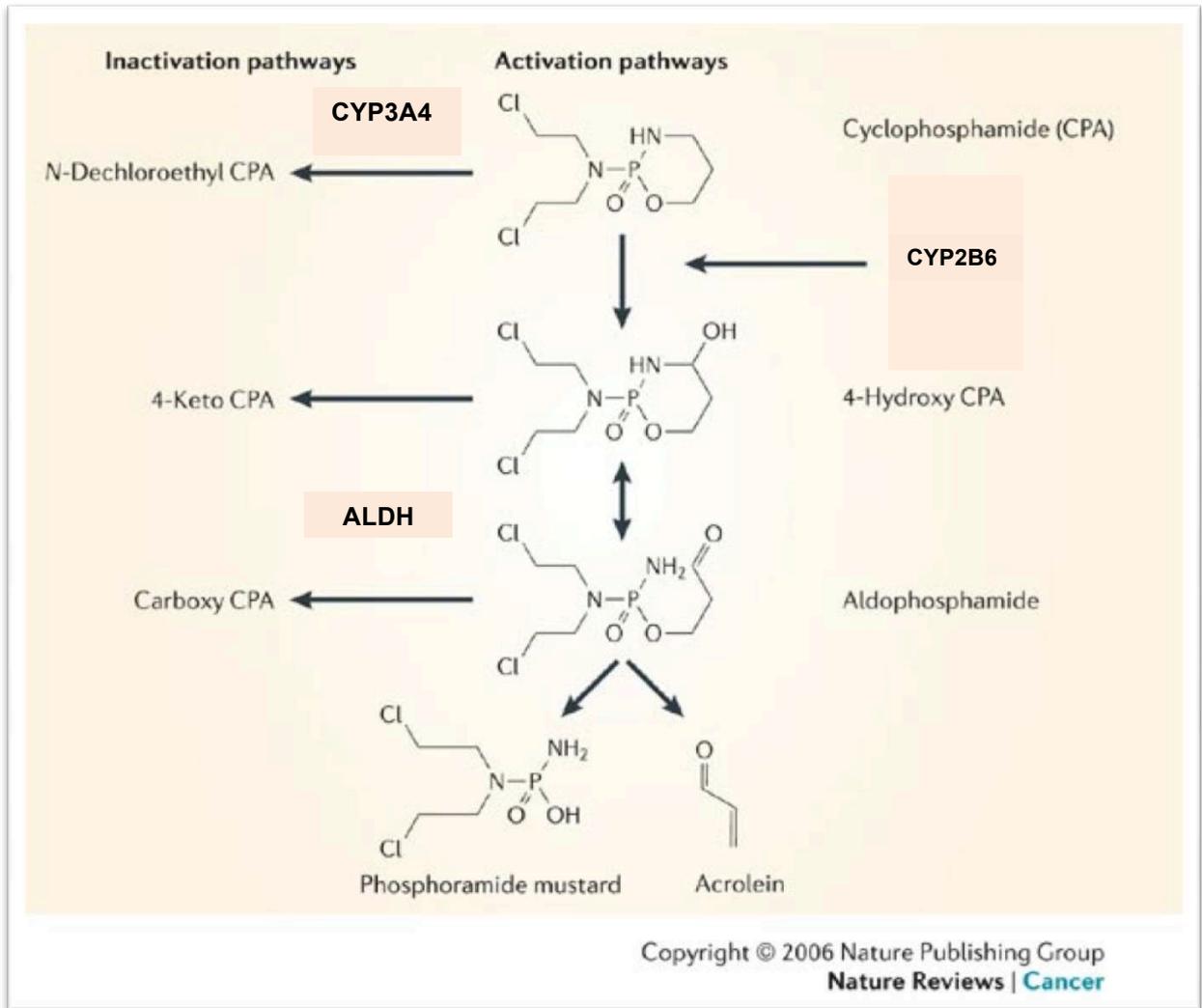


Figure 25 : Métabolisme et voie d'activation du Cyclophosphamide

(D'après Stearns et al., 2006)

Le cyclophosphamide est principalement métabolisé par le CYP2B6 associée à la RED en 4-OH-CPA. Ce dernier est en équilibre avec son tautomère, l'aldophosphamide. Ces dérivés peuvent conduire par une β-élimination spontanée à la formation d'acroléine (sans activité anticancéreuse), et d'un dérivé moutarde : la moutarde phosphoramidate (cytotoxique).

Le 4-OH-CPA peut être désactivé par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) en carboxyphosphamide qui n'a aucune activité anticancéreuse.

III.2.5.1 CYP2B / CYCLOPHOSPHAMIDE

Les cytochromes P450 de la famille 2B sont les isoformes les plus impliquées dans l'activation du cyclophosphamide (CPA) en métabolites cytotoxiques ayant une activité antitumorale.

Le cyclophosphamide (Endoxan[®]) appartient à la famille des oxazaphosphorines (Emadi et al., 2009). Chez l'Homme, il est principalement métabolisé dans le foie par le CYP2B6 en 4-hydroxy-cyclophosphamide (4-OH-CPA) (Gervot et al., 1999), les métabolites cytotoxiques atteindront donc la tumeur via la circulation sanguine systémique.

Dans le détail, les CYP métabolisent le CPA en un métabolite primaire, le 4-OH-CPA qui est en équilibre avec son tautomère : l'aldophosphamide. Ce dernier peut conduire par une β -élimination spontanée, à la formation d'acroléine et d'un dérivé moutarde : la moutarde phosphoramidate (Giraud et al., 2010) (**figure 25**).

La moutarde phosphoramidate est le métabolite alkylant possédant l'activité antitumorale : il génère des formes aziridium qui sont hautement électrophiles et interagissent avec l'ADN ou les protéines, tandis que l'acroléine est responsable de cystites hémorragiques.

Le CPA peut également être métabolisé, par une voie mineure impliquant le CYP3A4, en déchloroéthyl – CPA qui est inactif et en chloroacétaldéhyde qui est responsable d'effets toxiques sur le système nerveux et l'appareil urinaire.

Le 4-OH-CPA peut être désactivé par l'aldéhyde déshydrogénase en carboxyphosphamide qui n'a aucune activité anticancéreuse. Il a été montré sur des lignées tumorales humaines, qu'une surexpression de l'ALDH était synonyme d'une plus faible sensibilité au CPA (Magni et al., 1996). Le 4-OH-CPA est détoxifié par l'intermédiaire des Glutathione-S-Transférases (GST) (Niitsu et al., 1998) (Ekhart et al., 2008) (Ge et al., 2013). Ces enzymes sont

impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques, il s'agit d'enzyme de phase II (**figure 21**) ; celles-ci catalysent la conjugaison du glutathion avec des xénobiotiques et/ou leurs métabolites conduisant à la formation de composés hydrophiles éliminables dans la bile et les urines. Des polymorphismes de ces enzymes de phase II pourraient être à l'origine de variations dans la réponse au traitement CPA. Certains polymorphismes de ces transporteurs ont déjà été décrits comme responsables d'une moindre efficacité du traitement chez les patients (Hu et al., 2013). Cependant, à ce jour nous n'avons pas de connaissances précises des mécanismes mis en jeu par ces transporteurs dans le transport du CPA.

Outre le CYP2B6 humain, d'autres isoformes orthologues de la famille CYP2B ont été utilisées pour activer le CPA dans la tumeur. On peut notamment citer les travaux de l'équipe de Waxman qui a été la première à développer, dès 1994, des stratégies de gène suicide utilisant les CYP. (Wei et al., 1994) Des études chez l'Homme et le rat ont ainsi permis de mettre en évidence les CYP métabolisant le CPA (Clarke and Waxman, 1989) (Weber and Waxman, 1993) (Chang et al., 1993). Ils ont tout d'abord utilisé le CYP2B1 de rat pour activer le CPA dans une lignée de gliome de rat (lignée 9L). Lors de ces premiers essais, ils ont établi des lignées stables exprimant le CYP2B1 (Chen and Waxman, 1995). Les cellules exprimant le CYP2B1 ont ainsi pu être sensibilisées de manière significative au CPA. De même lors de ces travaux, des modèles animaux (rat) ont permis de confirmer la régression significative des tumeurs qui exprimaient le CYP2B1 (Wei et al., 1994) (Chen and Waxman, 1995). Pour confirmer les résultats sur des modèles humains, ils ont utilisé des lignées tumorales de cancer de sein dans lesquels le gène du CYP2B1 a été transféré. Un traitement au CPA de ces lignées a permis de les sensibiliser de manière significative (Chen et al., 1996).

Malgré ces bons résultats, l'équipe de Waxman a décidé de poursuivre ses études de recherche du CYP « idéal » dans le métabolisme du CPA (Jounaidi et al., 1998). Ils ont ainsi choisi les CYP 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19 et 3A4 qu'ils ont vectorisés à l'aide d'un rétrovirus et transférés dans une lignée de gliome de rat 9L. Les résultats de ces expériences montrent que le CYP2B6 est l'enzyme métabolisant le mieux le CPA. Dans cette étude, ils ont également montré que l'expression associée de la RED améliorerait les résultats avec une meilleure sensibilité au CPA.

Pour améliorer le métabolisme du CPA et donc l'efficacité antitumorale, le CYP2B11 de chien a aussi été utilisé. Il présente une affinité 10 fois supérieure pour le CPA que le CYP2B1 (Jounaidi et al., 2006) (Chen et al., 2007). Dans ce travail, ils ont une nouvelle fois utilisé la lignée de gliome de rat 9L. Les résultats sur cellules et sur modèles animaux ont montré une bien meilleure sensibilisation des cellules exprimant le CYP2B11 au CPA. Cependant un des inconvénients de cette enzyme réside dans le fait qu'elle n'est pas d'origine humaine avec le risque de réactions immunitaires lors d'un passage chez l'Homme.

III.2.5.2 CYTOCHROME P450 2B6

Chez l'Homme, la sous-famille 2B est constituée de l'isoforme 2B6. Le CYP2B6 est principalement exprimé dans le foie mais ne représente que 1 à 2 % de l'ensemble des CYP hépatiques (Mimura et al., 1993) (Shimada et al., 1994) (Gomez-Lechon et al., 2001). Il est également exprimé de manière beaucoup plus faible dans d'autres organes tels que le rein et le poumon, où l'expression semble être régulée de manière tissu-dépendante avec des variations d'épissage (Czerwinski et al., 1994) (Gervot et al., 1999), on en retrouve également en plus faible quantité dans les tissus cardio-vasculaires (Thum and Borlak, 2004), les macrophages alvéolaires et la muqueuse bronchique (Willey et al., 1997) (Mace et al., 1998)

(Raunio et al., 1999). Le CYP2B6 intervient dans le métabolisme de quelques médicaments fréquemment prescrits tels que : clopidogrel (antiagrégant plaquettaire) (Laizure and Parker, 2010), prasugrel (antiagrégant plaquettaire), bupropion (antidépresseur) (Loboz et al., 2006), efavirenz (anti-rétroviral) (Robertson et al., 2008), propofol (anesthésique) (Murayama et al., 2007), tramadol (anti-douleur), méthadone (substitut morphinique), cyclophosphamide (anticancéreux) (Gervot et al., 1999) ... La variété de substrats du CYP2B6, qui diffèrent par leurs propriétés chimiques et structurales, montre l'adaptabilité et la capacité de métabolisme de cette enzyme.

Le CYP2B6 est fortement induit par certains xénobiotiques tels que la rifampicine, la phénytoïne ou le phénobarbital. Ce dernier va agir *via* le « phénobarbital responsive enhancer module » (PBREM) localisé 1,7 kb en amont du promoteur du CYP2B6 et dans la partie distale du promoteur, 8,5 kb en amont, par l'intermédiaire du « xenobiotic responsive enhancer module » (XREM) qui va interagir avec les récepteurs PXR et CAR (Rendic, 2002).

Certains des substrats du CYP2B6 peuvent également jouer le rôle d'inhibiteur ; c'est le cas par exemple du clopidogrel, efavirenz, prasugrel... D'autres peuvent également jouer le rôle d'inducteur en favorisant l'expression du CYP2B6 et ainsi leur propre métabolisation ; par exemple le cyclophosphamide (Ekins et al., 2008) (Gervot et al., 1999).

Aujourd'hui, 48 allèles du CYP2B6 humain ont été mis en évidence avec pour certains des conséquences fonctionnelles (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2b6.htm>) (voir tableau des différents allèles en annexe V). Il a ainsi été montré chez des patients traités au CPA que ces différents polymorphismes pouvaient avoir des conséquences sur le métabolisme du CPA. Ainsi, par exemple, des études montrent que les personnes ayant un génotype

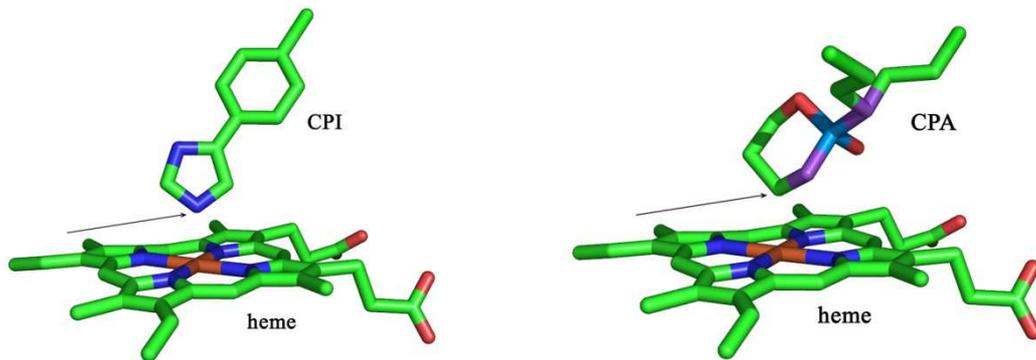


Figure 26 : Représentation schématique de l'hème du CYP en présence de CPI ou de CPA dans le site actif

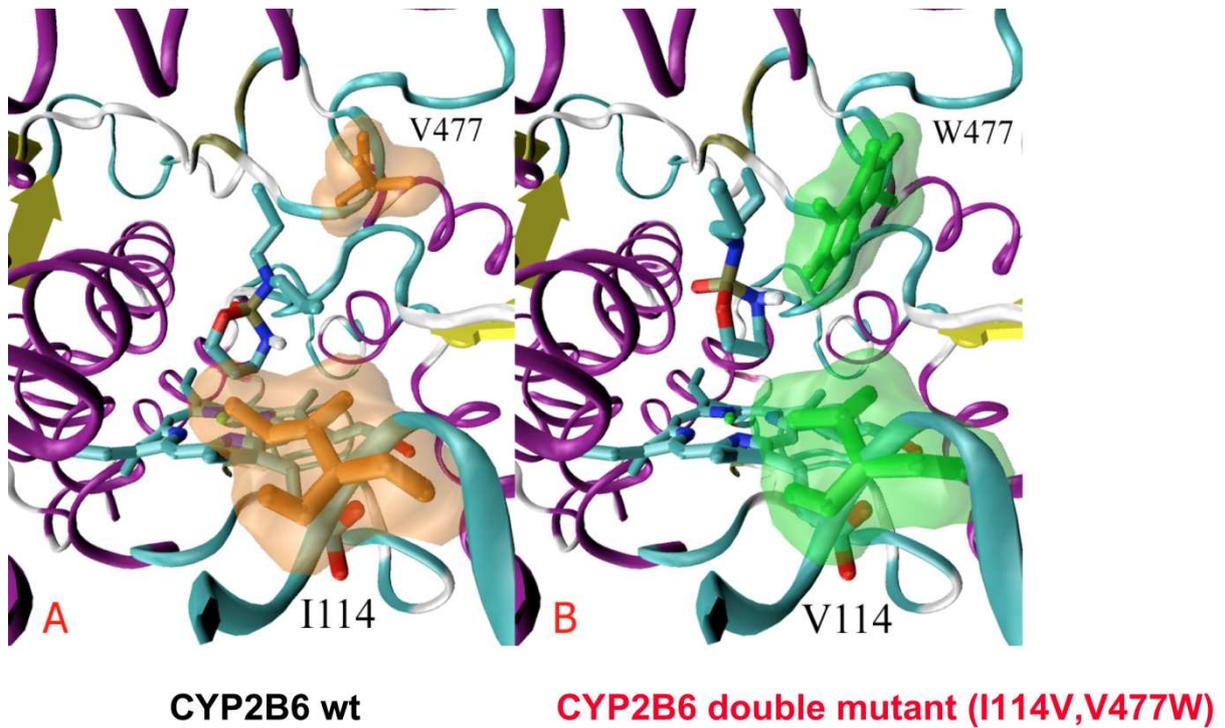


Figure 27 : Structure cristallographique du CYP2B6 sauvage (wild type, wt) (A) et du CYP2B6 double mutant (I114V, V477W) (B)

Les acides aminés sélectionnés pour être mutés sont représentés en orange sur la figure A ; les acides aminés mutés sont représentés en vert sur la figure B.

CYP2B6*6 sont ceux qui métabolisent le mieux le CPA. Au contraire les personnes ayant un génotype CYP2B6*1 métabolisent le moins efficacement le CPA (Xie et al., 2003) (Nakajima et al., 2007). Une revue détaillée des polymorphismes du CYP2B6 est disponible en annexe II.

III.2.5.2.1 CONSTRUCTION D'UN MUTANT CYP2B6

Une modélisation *in silico*, du CYP2B6 a été réalisée en collaboration avec les Dr. TA Nguyen et F. André (CNRS UMR8221, Laboratoire du stress oxydant et détoxication, iBiTec-S/SB2SM, CEA Saclay, Gif sur Yvette) à partir du CYP2B4 de lapin qui était l'isoforme cristallisée présentant la plus grande homologie de séquence en acides aminés (78%) avec le CYP2B6 (Scott et al., 2003) (Nguyen et al., 2008).

Grâce à la structure cristallisée du CYP2B4 (fichier PDB : 1SUO) complexée avec un inhibiteur du CYP2B4, le 4-(4-chlorophenyl) imidazole (CPI), dont la taille et la structure chimique sont très similaires au CPA (**figure 26**), celui-ci a été inséré *in silico* dans le site actif (Nguyen et al., 2008). Les 4 acides aminés les plus proches du CPA ont été identifiés (Ile 114, Val 367, Val 477 and Gly 478) et ont été mutés en différents acides aminés polaires, hydrophobes, chargés ou non. Après expression de ces différents mutants dans la levure *Sacchamoryces Cerevisiae*, les constantes cinétiques (K_m et V_{max}) de l'hydroxylation du CPA par les différents mutants ont été mesurées et 2 mutants (I114V et V477W) (**figure 27**) métabolisant, chacun, deux fois plus efficacement le CPA que le CYP2B6wt ont été identifiés ; le double mutant (I114V/477W) métabolisant le CPA quatre fois plus efficacement que le CYP2B6wt (Nguyen et al., 2008).

	Km (mM)	Vmax (min⁻¹)	Km/Vmax
Human CYP2B6 (wt)	4,90	62,5	12,8
CYP2B6 double mutant (V477W/I114V)	1,10	58,5	52,7
Rat CYP2B1	1,45	35,9	24,9
Rabbit CYP2B4	5,28	13,5	2,6
Rabbit CYP2B5	4,17	2,8	0,7
Canine CYP2B11	0,16	28,2	174,7

Tableau 3 : Constantes cinétiques du métabolisme du cyclophosphamide par différents cytochromes P450

Des simulations par dynamique moléculaire ont montré que ces deux mutations en réduisant la taille du site actif limitaient les déplacements du substrat dans le site actif et favorisait son positionnement par rapport à l'hème ce qui pouvait expliquer sa meilleure efficacité à métaboliser le CPA. Depuis, le CYP2B6 a été cristallisé (Gay et al., 2010) (3IBD.pdb : <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=3ibd>) et a permis de confirmer la structure modélisée de notre site actif.

Par ailleurs, à partir des données de la littérature, les constantes cinétiques de l'hydroxylation du CPA par différentes isoformes du CYP2B de plusieurs espèces ont été comparées (**tableau 3**).

Parmi ces isoformes, le CYP2B11 de chien était le plus efficace. Les séquences de reconnaissance du substrat (SRS) de ces différentes isoformes ont été alignées et six mutations présentes uniquement dans le CYP2B11 ont été identifiées. Ces différents mutants ont été construits et seule la mutation L199M augmentait l'efficacité du CYP2B6 à métaboliser le CPA par un facteur 2.

III.2.5.3 CYP2B / IFOSFAMIDE

L'ifosfamide (Holoxan®) est un anticancéreux appartenant à la famille des oxazaphosphorines. Il s'agit d'un analogue structural du CPA qui ne varie de ce dernier que par la position du groupement fonctionnel chloroéthyl. Il s'agit, de même, d'une prodrogue qui est activée par les cytochromes P450 métabolites cytotoxiques (moutarde ifosforamide, acroléine). Le métabolisme est semblable à celui du CPA ; l'ifosfamide (IFO) est métabolisé par les CYP en 4-hydroxy-ifosfamide (4-OH-IFO) qui existe en équilibre avec son tautomère l'aldo-ifosfamide (Chen and Waxman, 1995). Ce dernier peut être converti en métabolites cytotoxiques : moutarde ifosforamide et acroléine.

Des études ont été menées utilisant soit des CYP de la famille 2B6, 2C ou 3A4 (Jounaidi et al., 1998). Dans ces travaux, des lignées de gliomes de rat 9L ont été infectées à l'aide d'un rétrovirus exprimant les CYP humains 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19 et 3A4. Après transfert du gène, les cellules ont été sensibilisées à l'ifosfamide par rapport aux cellules contrôles. Ces études ont permis de montrer que le CYP le plus efficace dans le métabolisme de l'ifosfamide est le CYP3A4 (Jounaidi et al., 1998).

L'équipe de Lohr a utilisé le CYP2B1 de rat pour activer l'Ifosfamide (Karle et al., 1998) (Lohr et al., 1998) (Muller et al., 1999). Dans ces travaux, l'équipe a travaillé sur des tumeurs du pancréas. Le transfert du gène CYP2B1 est assuré par l'intermédiaire de cellules 293 (human embryonic kidney) encapsulées, dans lesquelles le CYP2B1 est exprimé de manière stable. Les cellules encapsulées ont été injectées à l'aide d'une aiguille directement dans des tumeurs de pancréas humaines xénogreffes à des souris. Après traitement intrapéritonéal à l'ifosfamide, les souris ayant reçu les cellules exprimant le CYP2B1 ont vu une régression de leur tumeur, voire une éradication pour une souris.

III.2.5.4 AUTRES CYP

D'autres cytochromes P450 ont été étudiés pour activer différentes prodrogues : CYP2B6, CYP2C, 1A1, CYP3A4... C'est notamment le cas par exemple du CYP3A4, 2B6 ou 1A1 qui permettent l'activation de la prodrogue AQ4N (McErlane et al., 2005). Celle-ci lorsqu'elle est activée, s'insère dans le double brin d'ADN et provoque ainsi des cassures. Ce qu'il est important de noter c'est que cette prodrogue ne pourra exercer ses effets qu'en conditions hypoxiques (Patterson and McKeown, 2000). Des études ont été menées sur des lignées cellulaires exprimant différents CYP, traitées à l'AQ4N *in vitro* et *in vivo*. Ces

résultats ont permis de mettre en évidence des améliorations au niveau des volumes tumoraux (McCarthy et al., 2003) (Yakkundi et al., 2006).

***ESSAIS CLINIQUES**

A ce jour, il n'existe qu'un seul essai clinique impliquant la combinaison CYP2B6/CPA. Ce protocole mis au point par Oxford Biomedica repose sur l'utilisation d'un vecteur rétroviral permettant l'expression du CYP2B6 associé à un traitement au cyclophosphamide, appelé MetXia[®]. Deux phases I/II ont été entreprises, incluant 12 patients ayant des tumeurs accessibles, cancer du sein (9 patients) ou mélanome (3 patients), à qui le vecteur rétroviral a été injecté directement dans la tumeur (Braybrooke et al., 2005). Les résultats obtenus ont été très modestes puisque seul un patient (cancer du sein) a connu une diminution très significative du volume tumoral ; quatre patients ont vu une stabilisation de la croissance tumorale tandis que pour les autres le volume tumoral a augmenté. L'une des explications réside dans la faible transduction du transgène, CYP2B6, dans les tumeurs (moins de 1 % des cellules tumorales). La faible expression de la RED dans la tumeur pourrait également expliquer une faible activation du CPA par le CYP2B6 du fait d'un faible transfert d'électrons, et donc une faible capacité de métabolisation.

Des développements pré-cliniques ont été réalisés avec d'autres cytochromes P450 (2B1, 3A4) et d'autres prodrogues (Ifosfamide) aboutissant pour certains à des essais cliniques de phase I/II.

Un essai clinique mettant en jeu un autre CYP a été mené par une équipe allemande. Ils ont utilisé le CYP2B1 de rat qu'ils ont transféré aux tumeurs à l'aide de cellules microencapsulées exprimant ce gène (Kroger et al., 2003) (Salmons et al., 2003). Ces cellules, HEK 293 (human embryonic kidney), ont ensuite été administrées à des patients ayant un adénocarcinome de pancréas via une artère. Les patients reçoivent par la suite de

l'ifosfamide. Sur les 14 patients inclus dans cette étude, 4 ont vu leur tumeur régresser et 10 ont stabilisé la croissance tumorale. Ces résultats encourageants cachent cependant des effets secondaires non négligeables puisque seulement 4 patients n'ont pas ressenti de douleurs significatives après traitement. De plus, cette méthode pourrait être améliorée car le CYP2B1 n'est pas l'enzyme métabolisant le mieux l'ifosfamide (Chen and Waxman, 1995). Malgré cela les promoteurs de l'étude ont créé une société, Austrianova (<http://sgaustria.com/>), qui s'occupe du développement de la stratégie et qui, depuis cet essai, envisage de développer un essai de phase III. A ce jour nous n'avons pas eu de nouvelles de cet essai.

Comme nous venons de le voir, de nombreuses combinaisons enzymes – prodrogues ont été mises au point dans les thérapies gène suicide. Si chacune de ces combinaisons présentent ses avantages et ses inconvénients, aucune ne s'est imposée en clinique en raison de résultats, chez l'Homme, moins bons que dans lors des phases précliniques.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Les stratégies de gène suicide ont connu un développement important aboutissant à des résultats précliniques encourageants. Malheureusement, le transfert à l'Homme n'a pas apporté les résultats escomptés.

Les raisons en sont, principalement :

- les enzymes utilisées sont faiblement actives
- trop peu de cellules tumorales sont transduites, limitant l'expression de l'enzyme.

Ainsi les concentrations de métabolites cytotoxiques tumorales sont insuffisantes.

Ce travail de thèse a pour objectif principal l'amélioration d'une stratégie gène suicide combinant le cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) et le cyclophosphamide en essayant de pallier aux inconvénients ci-dessus et d'obtenir une concentration de métabolites cytotoxiques suffisante dans les cellules tumorales ; il s'inscrit dans la suite d'un projet initié il y a quelques années au laboratoire (Tychopoulos et al., 2005) (Nguyen et al., 2008).

L'objectif de ce travail était donc de :

- Poursuivre l'optimisation du gène CYP2B6 permettant d'améliorer significativement le métabolisme et l'activation du cyclophosphamide,
- Démontrer *in vitro* la sensibilisation au cyclophosphamide de différentes lignées tumorales humaines ou murines, par l'expression du transgène optimisé,
- Prouver l'effet *bystander* dans ce système *in vitro* et *in vivo*,
- Mettre en évidence l'efficacité de notre stratégie *in vivo*, sur des souris immunocompétentes,

Les résultats obtenus sont présentés dans le manuscrit de l'article en cours de soumission.

Nous avons également élaboré des pistes de réflexion pour comprendre les mécanismes de l'effet *bystander* et améliorer le ciblage des cellules tumorales, qui seront présentées dans les annexes III, IV, V.

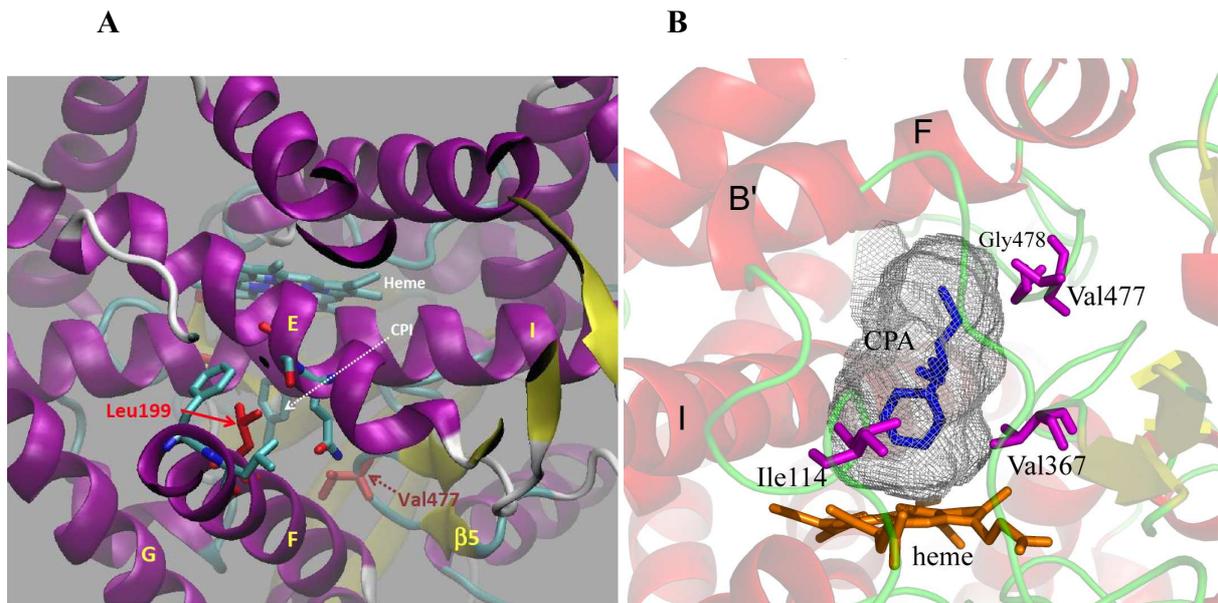


Figure 28 : Représentation schématique du canal d'entrée du substrat dans le CYP2B6 (A) et du site actif du CYP2B6 (B)

(Dr François André, CEA Saclay)

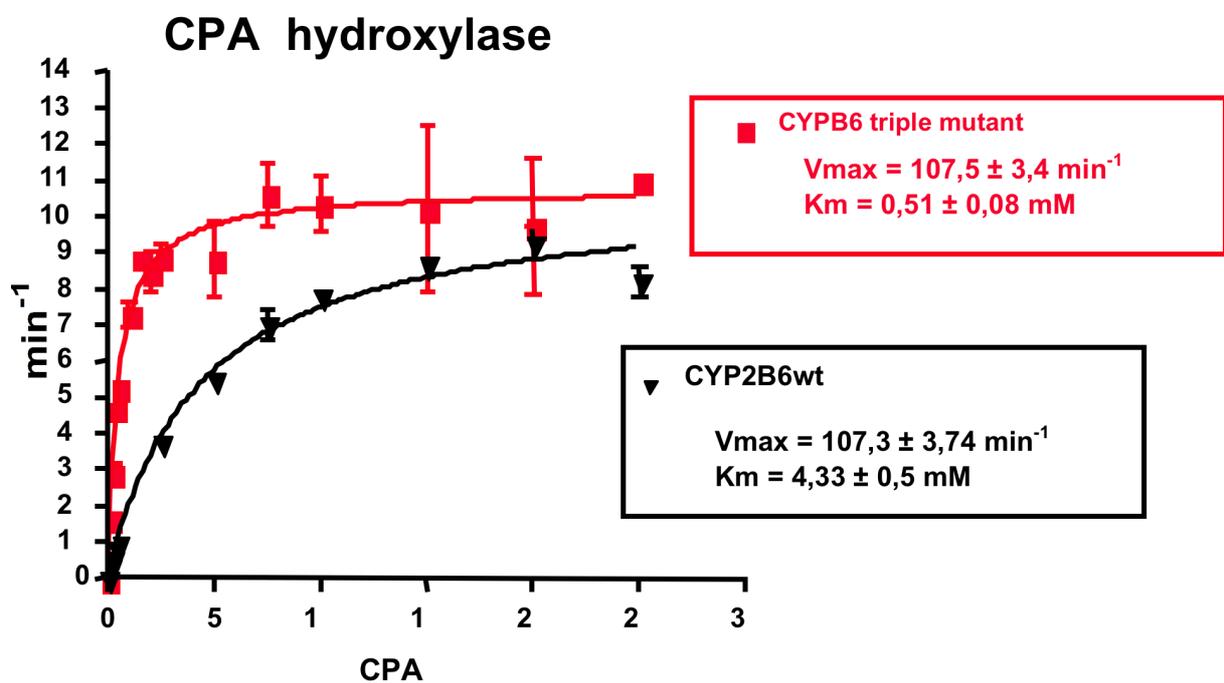


Figure 29 : Graphe représentant l'activité CPA hydroxylase de microsomes de levures exprimant le CYP2B6TM triple mutant (courbe rouge) ou le CYP2B6^{wt} wild-type (courbe noire)

PARTIE II : AMELIORATION DE LA STRATEGIE GDEPT CYP2B6 - CYCLOPHOSPHAMIDE

CHAPITRE II : OPTIMISATION DU GÈNE SUICIDE ET DE SON EFFICACITÉ

PRÉSENTATION DU TRAVAIL DE THÈSE

Mon travail de thèse s'inscrit dans la suite de résultats précédemment décrits : il a consisté, dans un premier temps, à optimiser le gène du CYP2B6 en introduisant une troisième mutation (L199M) pour obtenir un triple mutant (CYP2B6TM) capable de métaboliser le cyclophosphamide 8 fois plus activement que le CYP2B6^{wt} (**figure 29**). La cristallisation du CYP2B6 (Gay et al., 2010) a permis de montrer que cet acide aminé 199 était situé dans le canal d'entrée du substrat et de sortie des métabolites, ce qui pouvait expliquer cette meilleure efficacité à métaboliser le CPA (**figure 28**). Pour métaboliser leurs substrats, les cytochromes P450 ont besoin d'électrons qui leur sont fournis par la NADPH-CYP réductase (RED). Or, dans les tumeurs et les lignées humaines la RED est peu ou pas exprimée (Fitzsimmons et al., 1996) (Yu et al., 2001). Nous avons donc entrepris la construction d'un gène de fusion (CYP2B6TM-RED) permettant de s'assurer de l'expression, dans une même cellule tumorale, d'une enzyme possédant les deux activités catalytiques nécessaires à une métabolisation optimale du CPA. Ce gène de fusion CYP2B6TM-RED a fait l'objet d'un dépôt de brevet, en mai 2012, entré en phase nationale le 5 novembre 2013 (patent PCT/EP2012/058219 ; **voir annexe I**)

Dans un deuxième temps, j'ai démontré *in vivo* qu'une lignée tumorale pulmonaire humaine (A549), insensible au CPA, devenait sensible à cet anticancéreux après

transduction de ces cellules par un vecteur lentiviral recombinant exprimant le transgène CYP2B6TM-RED (Ce vecteur lentiviral a été produit en collaboration avec l'équipe du Pr. François Lemoine, UMR-S CNRS 7211/INSERM 959).

Enfin dans un troisième temps afin de démontrer l'efficacité de ce gène de fusion *in vivo*, j'ai mis au point des modèles animaux sur des souris immunocompétentes C57Bl/6 (plateforme d'imagerie du petit animal, en collaboration avec le Dr Johanne Seguin, INSERM U1022, CNRS UMR 8151, Unité de Pharmacologie Chimique et Génétique et d'Imagerie, Faculté de Pharmacie). J'ai injecté, en sous-cutané, des cellules d'une lignée tumorale pulmonaire issue de cette souche murine (TC1) exprimant le transgène. Comme pour la lignée A549, la lignée TC1 est insensible au CPA mais le devient après expression du transgène CYP2B6TM-RED. Par ailleurs, ces cellules TC1 expriment la luciférase (TC1-Luc2, Pr. Eric Tartour, INSERM U970) et le volume de la tumeur peut ainsi être mesuré par Bioluminescence (après injection de luciférine) grâce à une caméra Biospace Photon Imager. L'effet *bystander* a été étudié en injectant des mélanges de cellules tumorales exprimant et n'exprimant pas le transgène.

Une réinjection de cellules tumorales (*rechallenge*) chez les souris dans lesquelles les tumeurs ont été éradiquées, a permis de mettre en évidence le développement d'une réponse immunitaire spécifique dirigée contre les cellules tumorales.

Tous les résultats obtenus sont présentés dans le manuscrit intitulé « Suicide-gene cancer therapy associating enhanced prodrug activation, efficient *in vivo bystander* effect and cellular immune response », en cours de soumission.

**ARTICLE EN COURS DE SOUMISSION ET BREVET
PCT/EP2012/058219 (MAI 2012)**

Suicide-gene cancer therapy associating enhanced prodrug activation, efficient *in vivo* bystander effect and cellular immune response.

Walid Touati, Thi Tran, Johanne Seguin, Monique Diry, Jean-Pierre Flinois, Claude Baillou, Géraldine Lescaille, François André, Eric Tartour, François M Lemoine, Philippe Beaune, Isabelle de Waziers.

Brevet (annexe I)

Cover letter:

Gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT) is still a promising strategy although it has not yet demonstrated its actual potential. In this paper we increased *in vitro* and *in vivo* (animal models) its efficiency through three major mechanisms:

- a large increase in tumoral cytotoxicity thanks to a modification of the enzyme (mutagenesis of CYP2B6 activating cyclophosphamide
- an efficient *in vitro* and *in vivo* bystander effect by the increased *in situ* production of diffusible toxic metabolites
- the development of an anti-tumor immune response based on the induction of specific CD8+T cells and the decrease of regulatory T cells"

These improvements should allow to test this approach in clinics with reasonable probability of success.

Title page:

A novel cancer suicide gene therapy combining the improvement of cyclophosphamide tumor cytotoxicity and the development of an anti-tumor immune response

Authors: Walid Touati¹, Thi Tran², Johanne Seguin³, Monique Diry¹, Jean-Pierre Flinois¹, Claude Baillou⁴, Géraldine Lescaille⁴, François André⁵, Eric Tartour², François M Lemoine⁴, Philippe Beaune¹ and Isabelle de Waziers¹

Affiliations:

¹ INSERM UMR-S775, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, 45 rue des Saints Pères, 75006 Paris, France.

² INSERM U970, PARCC, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité. Faculté de Médecine, 20 rue Leblanc, 75015 Paris, France.

³ INSERM U1022, CNRS UMR8151, Paris Descartes University, Faculty of Pharmacy, Chimie ParisTech, Sorbonne Paris Cité, Chemical, Genetic and Imaging Pharmacology Laboratory, 4 avenue de l'observatoire, 75006 Paris, France.

⁴ UMRS CNRS7211/INSERM 959 Pierre et Marie Curie University, 83 boulevard de l'hôpital, 75013 Paris, France.

⁵ CNRS UMR8221, Laboratoire Stress Oxydant et Détoxication, Paris Sud University, iBiTec-S/SB2SM, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France.

Corresponding author:

Isabelle de Waziers, INSERM UMR-S775, 45 rue des Saints Pères, 75006 Paris, France.

Tel: 33 (0) 1 42 86 21 49, Fax: 33 (0) 1 42 86 20 72,

e-mail: isabelle.waziers@parisdescartes.fr

The authors disclose no potential conflicts of interest.

Statement of translational relevance

Early Phase I-II clinical trials, based on suicide gene therapy, using the cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) as drug-metabolizing enzyme and the prodrug cyclophosphamide, have been shown to be an attractive strategy against cancer. However several improvements can be introduced to increase significantly its efficiency, mainly by optimizing the suicide enzyme itself. This was the first aim of our work and we successfully built a human CYP2B6 mutant fused to reductase able to metabolize cyclophosphamide into cytotoxic metabolites 13-fold more efficiently than CYP2B6wt in tumoral cell lines. These *in vitro* improvements, translated in preclinical models, demonstrated that cyclophosphamide administered in immunocompetent mice bearing tumors expressing our fusion gene ensured a quick and complete tumor eradication reinforced thanks to a bystander effect, a long-term protection against relapses and a T-cell mediated immune response preventing tumor recurrence. This work was quite encouraging to pursue clinical trials on solid tumors.

Abstract:

PURPOSE: Gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT) consists in targeted delivery to tumor cells of a suicide gene responsible for *in situ* conversion of a prodrug into cytotoxic metabolites. One of the major limitations of this strategy in clinical application was the poor prodrug activation capacity of suicide gene.

EXPERIMENTAL DESIGN AND RESULTS: We built a highly efficient suicide gene capable of bioactivating the prodrug cyclophosphamide (CPA) by fusing a CYP2B6 triple mutant with NADPH cytochrome P450 reductase (CYP2B6TM-RED). Expression of this fusion gene via a recombinant lentivirus (LV) vector converted resistant human (A549) and murine (TC1) pulmonary cell lines into CPA-susceptible cell lines. We tested the efficiency of our GDEPT strategy in C57Bl/6 immunocompetent mice, using TC1 cells expressing the HPV-16 E6/E7 oncoproteins. In mice bearing tumors composed only of TC1-CYP2B6TM-RED cells, four CPA injections (140 mg/Kg once a week) completely eradicated the tumors for more than two months. Tumors having only 25% of TC1-CYP2B6TM-RED cells were also completely eradicated by five CPA injections, demonstrating a major *in vivo* bystander effect. Moreover, surviving mice were rechallenged with parental TC1 cells. The tumors regressed spontaneously 7 days after cell inoculation or grew more slowly than in control naive mice due to a strong immune response mediated by anti-E7CD8⁺T cells.

CONCLUSION: These data suggest that combining the CYPB6TM-RED gene with CPA may hold promise as a highly effective treatment for solid tumors in humans.

Introduction

Gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT) consists in targeted delivery to cancer cells of a suicide gene coding for an enzyme that converts a harmless prodrug into cytotoxic metabolites. The GDEPT systems most extensively characterized and evaluated in clinical trials to date are *Herpes simplex* virus thymidine kinase/ganciclovir, cytosine deaminase/5-fluorocytosine, and cytochrome P450/oxazaphosphorines (1-3). Concerning this last combination, few phase I studies were performed using rat CYP2B1 and ifosfamide (IFO) (4) (5) or human CYP2B6 and cyclophosphamide (CPA) (6). These treatments were safe and well tolerated, however their efficiency remained moderate, probably due, at least in part, to the weak affinity of both drugs for CYP2B1 and CYP2B6 (7, 8). Our goal was to build, from human CYP2B6WT, a suicide enzyme able to metabolize particularly efficiently the prodrug CPA into toxic metabolites. In previous work, we obtained a CYP2B6 double mutant associated with a 4-fold increase in CPA 4-hydroxylation, compared to CYP2B6WT (9). Given that CYP activity is dependent on electrons supplied by NADPH cytochrome P450 reductase (RED) and that RED expression is weak or absent in most tumor cells (10) (11), we sought to increase the efficiency of our strategy by using a Ser-Ser-Thr linker to obtain an active human CYP2B6WT-human NADPH P450 reductase (CYP2B6WT-RED) construct that was then expressed in mammalian cells (12). Our fusion protein was functional, with successful electron transfer from the flavin moiety to the heme in the CYP2B6 fragment of the protein. Then we optimized electron transfer by modifying the structure of the hinge region between the CYP2B6 and RED domains.

To achieve this step, we first designed a new CYP2B6 triple mutant (CYP2B6TM), induced its expression in *Saccharomyces cerevisiae*, and evaluated its catalytic activity using CPA as the substrate. Second, we used several linkers to connect the two protein

moieties and we assessed their ability to improve electron transfer in the *S. cerevisiae* expression system. Taking into account published data (13), we compared the CPA-metabolizing efficiency of these linkers used in our fusion protein.

We selected three fusion genes based on both high efficiency in metabolizing CPA and different RED catalytic activities (low, intermediate, and high, respectively). These constructs were inserted into HIV-derived lentiviral vectors (LVs), and recombinant lentiviral particles were produced and used for *ex vivo* genetic engineering of human non-small cell lung cancer cells (A549). These cells were used to compare the effectiveness of lentiviral constructs in metabolizing CPA. The most efficient construct was LV-CYP2B6TM-RED (linker 3Ser+Thr) and was used to develop animal models for *in vivo* testing of the efficiency of our GDEPT strategy.

CPA and its metabolites not only exert cytotoxic effects on tumor cells, but also promote an anti-tumor immune response by inducing immunogenic cell death and inhibiting Tregs (14) (15). These immunological effects may contribute to the success of cancer chemotherapy (16). Therefore, instead of using a conventional xenotransplant-immunodeficient mouse model, we developed a syngeneic tumor model in immunocompetent mice that allowed easy monitoring of both tumor growth (by luminescence analysis) and anti-tumor immune responses. CPA cytotoxicity increased dramatically, both *in vitro* and *in vivo*, when the tumor cells were genetically engineered with a CYP2B6TM-RED (linker 3Ser+Thr) lentiviral construct, compared to CYP2B6^{WT}-RED lentiviral construct. In addition, in various preclinical tumor models, the efficiency of our GDEPT strategy was increased by a marked *in vivo* bystander effect on uninfected (UI) tumor cells associated with the induction of an endogenous anti-tumor T-cell immune response responsible for long-term tumor protection.

Materials and methods

Construction of a CYP2B6 triple mutant and of several CYP2B6TM-RED fusion proteins

A CYP2B6 triple mutant was built by using site-directed mutagenesis to add a new L199M mutation to the CYP2B6 I114V/V477W double mutant cloned in the yeast expression vector V-60 (9). The soluble part of the RED protein, from bp171 to the stop codon TAG, was amplified from pUC18-hRED (17) using a PTC100 PCR thermocycler (MJ Research, Watertown, MA, USA) and several forward primers (supplemental data, Table 1) to introduce a XhoI site (or Sall site for linker 1Ser+Thr) and various linkers at 5' and a KpnI site at 3' using the reverse primer 5' GGTACCTCTAGCTCCACACGTCCAGGGAG 3'. PCR conditions were 10 minutes at 94°C then 30 cycles at 94°C for 30 seconds, 68°C for 30 seconds, and 72°C for 1 minute; followed by a final 10-minute extension phase at 72°C. All PCRs were performed using Taq Polymerase (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). V60-CYP2B6TM was digested by XhoI (which removed the CYP2B6TM stop codon) and KpnI. The PCR products containing the soluble part of the RED-linker fusion constructs were purified, digested by XhoI (or Sall) and KpnI, and cloned into V60-CYP2B6TM digested with the same enzymes. The constructs were sequenced using an automatic Perkin Elmer sequencer (Courtaboeuf, France) to check the integrity of the linker sequence and reading frame.

Expression in yeasts

V60-CYP2B6TM-RED constructs were expressed in the W(R) yeast strain characterized by overexpression of yeast NADPH RED, using a refined lithium acetate-mediated protocol (18). Yeast culture conditions and preparation of the yeast microsomal fractions have been described previously (9). Microsomal P450 content was spectrally determined (19).

Catalytic activity

We measured 4-OH CPA and NADPH RED activities and CPA hydroxylase kinetic parameters (K_m and V_{max}) on microsomal preparations from yeasts expressing the various constructs, as previously described (9) (12). Moreover, RED-activity kinetic parameters in A549-clone microsomes were determined using nonlinear regression with 15 substrate concentrations (0.4 to 200 μ M of cytochrome c as the electron acceptor and 2 to 150 μ M of NADPH as the electron donor). Data were analyzed using Prism software (Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA) to calculate kinetic parameters (K_m , V_{max}); V_{max} values were expressed as nmoL/min/mg of microsomal protein.

Cell culture and microsomal preparation

A549 human non-small cell lung cancer cells (ATCC-CCL-185) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), streptomycin (50 μ g/mL), penicillin (200 U/mL) and fungizone (0.5 μ g/mL). TC1 cells are derived from a murine lung epithelial-cell line expressing the HPV16 E6-E7 proteins and firefly luciferase gene (TC1-Luc2). They were developed by Dr. TC Wu (Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA) (20). TC1 cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, streptomycin (100 μ g/mL), penicillin (100 U/mL), G418 (0.4 mg/mL), and sodium pyruvate (1 mM). The cells were maintained in a humidified incubator at 37°C and 5% CO₂. For microsomal preparations, cells were trypsinized and washed twice with PBS, and the cell pellet was resuspended in STE buffer (0.25 mM sucrose, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4) containing antiproteases (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) then sonicated. The sonicated lysates were centrifuged at 9000 g for 20 minutes and the supernatant was then centrifuged at 100 000 g for 1 hour to produce a pellet containing the microsomes, which was resuspended in phosphate buffer (100 mM NaPO₄, 10 mM MgCl₂, 20% glycerol (w/v) at pH 7.4), aliquoted, and frozen at -80°C.

Lentiviral vector (LV) constructs and production of lentiviral particles

CYP2B6WT-RED (same construct than that used previously (12)) and all LV-CYP2B6TM-RED constructs were derived from the pHIV-EF1L-thy1/GFP-W+ construct (21). All constructs contained the cPPT and WPRE (W+) sequences. The cassettes were under the control of the full-length elongation factor 1 α promoter (EF1L). Briefly, thy1/GFP genes were cut out from pHIV-EF1L-thy1/GFP-W+ and the various CYP2B6TM-RED sequences were then inserted between the BamHI and MluI restriction sites.

Production of lentiviral particles and viral titration

Lentiviral particles pseudotyped with the VSV-G envelope glycoprotein were produced into 293T cells using calcium phosphate precipitation of gag-pol, env, and vector plasmids. pCMV Δ R8.91 and pMD.G, kindly provided by D. Trono (Geneva, Switzerland), encode the HIV-1 gag and pol precursors and the vesicular stomatitis virus envelope G protein (VSV-G). Env (9.7 μ g), gag-pol (21.6 μ g), and vector (27 μ g) plasmids were co-transfected into $20 \cdot 10^6$ 293T cells and the viral supernatants were harvested and concentrated (21). Viral titers (number of infectious lentiviral particles/mL) were measured in fresh viral supernatants using a p24 ELISA (ZeptoMetrix, Buffalo, NY, USA). Observed titers ranged from 2 to $7 \cdot 10^8$ p/mL.

Lentiviral infection

Using 12-well plates, we seeded 10^5 cells into each well 48 hours before inducing infection with lentiviral particles at an MOI of 200 in 500 μ L of culture medium and 8 μ g/mL of protamine sulfate. We added 1 mL of fresh medium 4 hours later; 24 hours after infection, the medium containing the lentiviral particles was replaced by fresh medium. The genetically engineered cells were then cultured before use, as described above.

Western blots

Microsomal proteins (20 to 40 µg, prepared from the cultured cell lines) were loaded onto 8% SDS/polyacrylamide gel. Protein concentrations were determined using the bicinchonic acid (BCA) procedure according to the manufacturer's instructions (Pierce, Rockford, IL, USA). The proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane and probed with polyclonal anti-CYP2B6 (22) or anti-NADPH RED (LifeSpan Bioscience, Seattle, WA, USA). The membranes were washed, exposed to a secondary antibody linked to HRP, and developed using an ECL kit (Amersham, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

Generation of clones

A549 cells were infected with three CYP2B6TM-RED lentiviral constructs that differed regarding the linker, which was 3Ser+Thr or 5Ser+Thr or 7Ser+Thr. Cells were then selected with two series of limiting dilutions in 96-well plates. For all the clones obtained for each construct, CYP2B6TM-RED expression was monitored by Western blotting. One clone per construct was chosen so that the three clones had similar levels of fusion protein expression. These three clones were used to compare CPA metabolism efficiency.

Cytotoxicity assays

For the *in vitro* cytotoxicity assays, infected cells were plated in a 96-well plate at a concentration of 10 000 cells/well. After 24 h, CPA in concentrations ranging from 0 to 3 mM was added. After 2-3 days, the effect of CPA was measured using the MTS-colorimetric assay Cell-titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Charbonnières, France) according to the manufacturer's instructions. Cell viability was calculated as the percentage of absorbance measured in cells infected with LV-GFP or LV-

CYP2B6TM-RED and treated with CPA relative to the percentage of absorbance measured in the same cells without CPA. Assays were repeated four times in triplicate.

Animal models

In vivo studies were performed on 10-week-old female C57BL/6 mice (Janvier, Saint-Berthevin, France). All animal experiments were conducted in accordance with ethical guidelines and were approved by the animal ethics committee of the Paris Descartes University (CEEA34.IW.031.11).

Animal model 1, $5 \cdot 10^5$ TC1-Luc2 cells with or without previous CYP2B6TM-RED (3Ser+Thr) LV infection were diluted in 50 μ L PBS and injected into the subcutaneous tissue of the flank of 10 mice/group, after anesthesia with 80 mg/Kg ketamine (Merial, Lyon, France) and 10 mg/Kg xylazine (Bayer Animal Health, Puteaux, France), as described above.

Animal model 2, mice were injected with either CYP2B6TM-RED (3Ser+Thr) TC1-Luc2 or with a mix containing 25% of CYP2B6TM-RED (3Ser+Thr) TC1-Luc2 and 75% of uninfected TC1-Luc2 cells (UI-TC1-Luc2) (12 mice/group). Tumor growth was evaluated twice a week by luminescence and Vernier caliper measurement and was expressed as volume (mm^3) = $(L \times l^2)/2$. For luminescence imaging, 200 μ L of luciferin 33 μ M (Synchem, Chicago, IL, USA) diluted in PBS was injected intraperitoneally; 20 minutes later, after isoflurane anesthesia, luminescence was detected using a Biospace Photon Imager camera (BiospaceLab, Paris, France) and the photos were analyzed using image-analysis software (BiospaceLab).

When tumor size approached 500 mm^3 , half the mice in each group were treated with CPA (Endoxan®, Baxter, Maurepas, France) diluted in sterile PBS, in a dose of 140 mg/Kg intraperitoneally once a week for 4 or 5 weeks. Blood samples were collected from the retro-orbital vein into EDTA tubes (Vacuette®, Greiner bio-one, Courtaboeuf, France) 6

days after the first CPA injection. Whole-blood cell counts were determined using an MS9-5 robot (Melet Schloesing Laboratoires, Osny, France).

Rechallenge

Mice were anesthetized and given a subcutaneous injection of $2.5 \cdot 10^5$ UI-TC1-Luc2 cells diluted in 50 μ L PBS. Tumor growth was evaluated by luminescence and Vernier caliper measurements. The mice were sacrificed and their spleens collected and kept in medium.

Anti-E7 CD8⁺T cell response

Splenocytes were harvested and CD8⁺T cells were purified with anti-CD8-coated magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch, Germany). CD8⁺T cell specificity was analyzed by tetramer staining or EliSpot.

Tetramer analysis

To detect anti-E7₄₉₋₅₇/D^b specific CD8⁺ T cells, cells were stained with E7₄₉₋₅₇/D^b tetramer according to the manufacturer's recommendations (Beckman-Coulter Immunomics, Marseille, France) (23).

Ex vivo EliSpot assays

Purified CD8⁺ cells were incubated in EliSpot plates with medium D^bE7₄₉₋₅₇ restricted peptide. The plates were incubated for 18 to 21 hours at 37°C with 5% CO₂. IFN- γ spots were revealed according to the manufacturer's instructions (Gen-Probe Diaclone, Besançon, France). Spot-forming cells were counted using the C.T.L. Immunospot system (Cellular Technology Ltd., Bonn, Germany).

Statistical analysis

Results are described as the mean±standard deviation (SD) of n experiments and compared between groups using the two-tailed Student's t -test.

Results

Yeast expression of CYP2B6WT, CYP2B6TM, and CYP2B6TM-RED fusion proteins

Based on our previous work (9), a third mutation, L199M, whose catalytic efficiency was twice that of CYP2B6WT, was introduced into our CYP2B6 double mutant (I114V/V477W), whose catalytic efficiency was 4 times that of CYP2B6WT. After expression in yeast, this I114V/L199M/V477W CYP2B6 (CYP2B6TM) triple mutant was 8 times more efficient in metabolizing CPA compared to CYP2B6WT, mainly as a result of increased enzyme affinity (K_m) (Table 1). Fusion of CYP2B6TM with RED did not substantially affect catalytic efficiency (V_{max}/K_m), regardless of the linker used. In contrast, RED activity varied considerably with linker size, from 72.1 to 652.8 nmoL/min/mg of microsomal protein. We used these results to select three constructs (indicated with asterisks in Table 1) exhibiting low, intermediate, and high RED activity, respectively, for LV production.

Comparison of CPA sensitization of A549 clones expressing the three fusion genes

To compare the efficiency of the three fusion genes differing by their linkers, we generated A549 clones expressing each fusion gene. Three clones, one for each fusion gene, were selected as having similar fusion-gene expression levels estimated by Western blotting. CPA hydroxylase and RED activities were measured on microsomes of the three clones (Table 2). CPA hydroxylase activity was comparable in the two clones expressing fusion genes with the 3Ser+Thr and 5Ser+Thr linkers but was lower in the clone whose fusion gene had the 7Ser+Thr linker. RED efficiency in reducing cytochrome c or transferring electrons from NADPH was highest in the A549 clone expressing CYP2B6TM-RED with the 3Ser+Thr linker. Furthermore, *in vitro* CPA (0-3 mM) cytotoxicity tests were performed on the three A549 (CYP2B6TM-RED) clones and on A549 cells infected with the recombinant LV CYP2B6WT-RED (Figure 1). After 48 hours

of CPA treatment, CYP2B6WT-RED-transduced A549 cells had an IC_{50} (here, 50% of dead cells) of about 6.5 mM, a value about 10 times that found with the clones expressing CYP2B6TM-RED, all of which had IC_{50} values between 0.5 and 0.8 mM (Figure 1). Because the CYP2B6TM-RED fusion gene with the 3Ser+Thr linker had the highest CPA hydroxylase and reductase activities and the lowest IC_{50} after expression in A549 cells and CPA treatment, it was chosen to develop animal models.

Sensitization to CPA of TC1-Luc2 cells expressing CYP2B6TM-RED (3Ser+Thr linker)

Animal models were established using immunocompetent C57Bl/6 mice and a pulmonary tumor-cell line established from the same strain and constitutively expressing luciferase (TC1-Luc2) (20). This cell line was insensitive to CPA up to 3 mM (data not shown). After expression of CYP2B6TM-RED (3Ser+Thr) and 48 hours of CPA treatment, the IC_{50} (0.7 mM) was comparable to that observed in A549 clones (Figure 1). Therefore, for the *in vivo* evaluation of the validity of our approach, we used TC1-Luc2 cells with or without lentiviral engineering to express CYP2B6TM-RED (3Ser+Thr).

Curative efficiency of CPA in mice bearing CYP2B6TM-RED-positive tumors

Animal model 1: UI TC1-Luc2 cells and TC1-Luc2 cells previously infected with LV-CYP2B6TM-RED (3Ser+Thr) (TC1-Luc2 CYP2B6TM-RED) were injected subcutaneously into the left flank of C57Bl/6 mice (10 mice/group).

CPA treatment was started when tumor volume was about 500 mm³, *i.e.*, 12-13 days after tumor cell inoculation. In five mice of each group, CPA was injected intraperitoneally once a week for 4 weeks, in a dose of 140 mg/Kg. In mice without CPA treatment, tumors generated from uninfected or infected cells grew in a similar manner; these animals were sacrificed when tumor volume reached about 2000 mm³ (Figure 2A).

In mice with TC1-Luc2 CYP2B6TM-RED tumors, tumor volume decreased markedly immediately after the first CPA injection, and four CPA injections were sufficient to achieve complete tumor eradication. The tumor eradication profile was identical in all five mice. On day 84, 50 days after the last CPA injection, no tumor was detected in any of the mice by luminescence signal or Vernier caliper measurements (Figure 2A,B). In mice bearing UI TC1-Luc2 tumors, tumor size decreased during CPA treatment. However, at the end of CPA treatment, all the tumors recovered their previous growth rate more or less rapidly, explaining the large standard deviations, and all animals had to be sacrificed within 20 days following the last CPA injection.

Animal model 2: To study the bystander effect *in vivo*, we developed a second animal model. Either TC1-Luc2 CYP2B6TM-RED cells, as in the first animal model, or a mixture of 25% TC1-Luc2 CYP2B6TM-RED and 75% UI TC1-Luc2 cells (designated Mix) were injected subcutaneously into the left flank of 12 mice per group (Figure 2C). The first intraperitoneal CPA injection (140 mg/Kg) was given 13 days after tumor cell inoculation, to six mice per group. In the untreated mice, both tumor types showed comparable growth (similar to that seen in the first model), and all these mice were sacrificed on day 21. Mix tumors stopped to grow after the first CPA dose and began to shrink after the second CPA dose. As with the first model, TC1-Luc2 CYP2B6TM-RED tumors decreased as soon as the first CPA dose. Subsequently, tumor size decreased similarly in both groups, with a slight delay in the Mix group. This delay prompted a fifth CPA injection, after which no tumor luminescence signal was detected in any mice in either group. More than 3 weeks after the last CPA injection, no luminescence was detectable in any of the mice inoculated with TC1-Luc2 CYP2B6TM-RED or Mix cells.

CPA treatment of mice bearing CYP2B6TM-RED-positive tumors induces an anti-tumor immune response and protects mice from tumor rechallenge.

In animal model 1, 1 month after the last CPA injection, the mice surviving after tumor eradication were rechallenged with UI TC1-Luc2 cells injected into the right flank. CPA was not administered. Controls were same-age mice with no history of tumor cell injection or CPA treatment. Tumors grew in all five rechallenged mice. However, in three of these mice (#1, #3, and #5) the tumors regressed spontaneously between day 7 and day 10 (Figure 3A) and in the remaining two mice (#2, and #4) the tumors grew more slowly than in the control mice. Luminescence images from three rechallenged mice (#1, # 2, and #3) are shown in Figure 3B. In mice #1 and #3, a luminescence signal was detectable on day 4 but not on day 7, whereas in mouse #2 the tumor continued to grow until day 20. All the mice were sacrificed on day 26, at which time no tumor was detectable in mice #1, #3, and #5.

In surviving mice with TC1-Luc2 CYP2B6TM-RED tumors from animal model 2, comparable results were observed after UI TC1-Luc 2 rechallenge, with complete tumor regression between days 7 and 10 in two mice (#1 and #4) and slower tumor growth in the remaining four mice than in the control mice (data not shown). UI TC1-Luc 2 rechallenge of surviving mice with Mix tumors was followed by complete tumor regression in one mouse and slower tumor growth compared to controls in the remaining five mice.

To elucidate the mechanisms causing the complete or partial protection against parental TC1 tumors in the rechallenged animals, we analyzed the anti-tumor response by focusing on anti-E7 CD8⁺T cells, identified previously as capable of mediating tumor protection (24). We found that mice with complete tumor regression after parental TC1 rechallenge exhibited a significant anti-E7₄₉₋₅₇ CD8⁺T-cell response (Figure 4). In the first animal model, anti-E7 CD8⁺T cells were detected in the three mice (#1, #3, and #5) with

complete tumor regression (Figure 4A,B). Furthermore, these anti-E7 specific CD8⁺T cells were identified within the tumors, a finding that further supported their protective role (data not shown). In the second animal model, functional anti-E7-CD8⁺T cells were also detected by EliSpot assay in the two mice free of tumor after rechallenge (#1 and #4) (Figure 4C). Anti-E7 CD8⁺T cells were not detected in any of the naive mice or mice with progressive UI TC1-Luc2 tumors (data not shown).

Discussion

Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths worldwide and manifests in 87% of cases as non-small cell lung cancer, which has a 5-year survival rate of only 15% with currently available management strategies (25), indicating a pressing need for innovative treatments. Here, we focused on a new suicide-gene therapy approach, using human and murine pulmonary cell lines as models.

The first aim of our work was to use two human genes to build a highly efficient therapeutic suicide gene capable of converting the prodrug CPA into cytotoxic metabolites. The CYP2B6TM enzyme encoded by this suicide gene exhibited an 8-fold increase in CPA catalytic efficiency compared to CYP2B6^{WT}. A recent study involving crystallization of CYP2B6^{WT} (26) demonstrated that the I114 and V477 amino acids were located in the active site, as predicted by our previous molecular model (9). Mutations producing amino acids of greater bulk confirmed our hypotheses that the V477W mutation led to steric hindrance with better stacking of the ligand in the active site and that the I114V mutation promoted CPA accessibility and widened the active site near the heme group, thereby optimizing CPA position. Both mutations resulted in greater CPA-metabolizing efficiency. Leu 199 is a pivotal hydrophobic residue that contributes to join the intersecting helices E and F. Therefore, L199M mutation may impact the stability of E-F helix packing in this region, near the entrance to the “S” (solvent) channel. This channel is exposed to the cytosol, above the membrane, and is believed to contribute to water molecule access, although it can also be large enough to allow the egress of polar metabolites. The increased CPA-metabolizing efficiency seen with the residue-199 mutation may be related to a change in flexibility and/or in the environment of the “S” channel exit (supplemental data, Figure 1).

To ensure that electron transfer from NADPH, crucial to CYP2B6 catalytic activity, was not rate limiting, we built a functional fusion gene including the NADPH RED gene, and we optimized the linker connecting the two genes to produce a construct having high RED activity. In an investigation of linker peptides joining domains in 51 natural protein tertiary structures, Argos (13) showed that Thr, Ser, Gly were the best linker constituents. Moreover, a peptide linker used to connect two polypeptide domains and comprising a large proportion of serine residues results in improved fusion-protein resistance to proteolysis. Based on this study and on our previous results, we compared the CPA-metabolizing efficiency of our fusion protein obtained with various linkers. The 3Ser+Thr linker produced the greatest efficiency in catalyzing the reduction of cytochrome c (as an electron acceptor) when the fusion gene was expressed in yeasts (Table 1) and in reducing cytochrome c or transferring electrons from NADPH when the gene was expressed in A549 pulmonary cells (Table 2). Moreover, fusion gene expression led to a 13-fold decrease in the CPA concentration needed to kill 50% of transduced A549 cells within 48 hours (Figure 1), compared to that required using CYPB6WT-RED in our previous work (12). Thus, our fusion gene (patent PCT/EP2012/058219) is both necessary and sufficient to achieve full CPA activation without involvement of endogenous enzymes, which might be mutated or not expressed in most tumors.

RED can transfer electrons much faster than CYP can use them, which may account for the low RED-to-CYP ratio of 1:10 in liver microsomes (27). The high RED activity of our fusion gene probably far exceeded the level needed to supply electrons to CYP2B6TM and might allow concomitant activation of bioreductive prodrugs into reduced cytotoxic metabolites. These prodrugs, such as tirapazamine or mitomycin C, are preferentially bioactivated by RED under hypoxic conditions (28), which are prevalent in rapidly growing tumors (29). Previous reports showed an additive tumor growth-inhibiting effect of

bio-reductive drugs combined with radiotherapy to treat RED-overexpressing tumor xenografts (30). Thus, combining CPA with bio-reductive prodrugs might increase the cytotoxic efficiency of our suicide gene.

The second part of this work consisted in obtaining *in vivo* data on the efficiency of our suicide gene. Tumor cell death triggered by chemotherapy may promote the activation of immune effector cells (31). Until now, the validation of suicide-gene therapies relied mainly on human xenografts transplanted into immunodeficient mice, an approach in which a possible contribution of the host immune system to tumor eradication cannot be evaluated (32). To assess the potential role for the innate immune system in our GDEPT strategy, we developed animal models using immunocompetent mice and a murine pulmonary cell line (TC1) that was genetically engineered to constitutively express luciferase (TC1-Luc2). By contrast to our previous studies (9) (12), we used recombinant lentiviruses instead of adenoviruses to express our fusion gene in tumor cells. Lentiviral gene therapy has been validated in clinically relevant animals using different GDEPT strategies (33-35) and is currently being studied in a wide range of human diseases (36).

After subcutaneous injection of transduced or nontransduced TC1-Luc2 cells, tumor growth was measured twice a week. Of note, fusion gene expression did not alter tumor growth in the absence of CPA. When tumor size reached 500 mm³, CPA was injected intraperitoneally once a week in a currently used dose (140 mg/Kg). This injection schedule repeatedly induces tumor cytotoxicity, inflammation, and cytokine/chemokine attractant activation, leading to an innate immune response; but involves sufficiently infrequent injections to minimize the killing of immune cells recruited to the tumor (37, 38). Expression of our fusion gene in tumor cells resulted in complete tumor eradication after only four CPA injections, without any recurrence for up to 7 weeks after the last injection (Figure 2). Tumor volume decreased in CPA-treated control mice. There are three Cyp2b

genes (Cyp2b9, Cyp2b10 and Cyp2b13), orthologous to human CYP2B6, expressed in the mouse liver (39), and able to bioactivate CPA. The liver may produce 4-OH CPA, which may then reach the tumor through the blood. The 60-fold higher CPA activation rate in mice compared to humans (40) may explain the tumor shrinkage seen in the absence of fusion gene expression. However, tumor growth occurred when treatment was stopped. In humans, given the marked affinity of CPA for our fusion gene compared to CYP2B6WT expressed mainly in the liver, the hepatic metabolism of CPA would be limited.

In gene therapy targeting solid tumors, therapeutic gene transfer to all the tumor cells is unlikely to occur with the currently available *in vivo* delivery systems. A bystander killing effect on nontransduced cells, together with a long-term antitumor effect, is thus required. To evaluate the bystander effect *in vivo*, we used a previously reported method (41, 42) consisting in inoculation of a mixture of cells with and without suicide gene expression. A strong bystander effect was observed: 25% of CYP2B6TM-RED-expressing cells was sufficient to kill all tumor cells after five CPA injections (Figure 2).

It has recently become clear that the tumor microenvironment, and most notably the immune system, has a crucial role in modulating tumor progression and the treatment response (14). To ensure, in these immunocompetent mice, that this potential response was not directed against the fusion protein, we injected UI TC1-Luc2 cells in tumor rechallenge experiments. In some cases, a complete tumor eradication was observed (Figure 3) without CPA treatment, consistent with a T cell-mediated immune response (Figure 4). To our knowledge, this finding is the first reported evidence of an immune response directed against tumor cells during GDEPT. This immune response may constitute a major advantage of our strategy, as it may prove capable of preventing the development of metastases.

The cytotoxic alkylating agent CPA can selectively inhibit Tregs (43, 44), as observed in the present study (supplemental Figure 2). Tregs suppress immune responses both systemically and in the tumor environment (45), thus playing a major role in preventing successful vaccination and immune-based therapies (46). In humans with advanced cancer, oral metronomic CPA therapy markedly and selectively decreases circulating Treg counts and suppresses the ability of Tregs to inhibit conventional T cells and NK cells, thereby restoring peripheral T-cell proliferation and innate killing activities (47). As indicated previously, Treg inhibition may explain the ability of our strategy to induce anti-E7 specific CD8⁺T cells (48). Given that the CPA doses active in our GDEPT strategy predominantly decreased Tregs (supplemental Figure 2) and increased specific T cells (Figure 4), combining our strategy with cancer vaccines might result in increased effectiveness.

One of the major goals of GDEPT is specific suicide-gene targeting to the tumor cells. We are currently considering two gene delivery methods, namely, intratumoral injection of the recombinant lentivirus as previously evaluated for gliomas (33) and pancreatic tumors (41) or administration of mesenchymal stem cells (MSCs) that selectively migrate to tumors (49, 50). MSCs infected with our recombinant lentivirus could be injected intravenously to allow migration to tumors and *in situ* CPA bioactivation. The bystander effect reported herein might allow 4-OH CPA diffusing from MSCs to tumor cells to kill both cell types and to trigger an immune response.

In summary, these encouraging *in vitro* and *in vivo* data suggest that our CYP2B6TM-RED fusion gene/CPA system might constitute a powerful *in vivo* gene therapy approach to solid tumors. The combined use of bioreductive prodrugs or vaccines might further improve the therapeutic effects. Further studies of delivery systems, doses,

and treatment combinations are needed to optimize this approach before embarking on human clinical trials.

Acknowledgments:

This work was supported by Canceropole Ile de France. Walid Touati was a graduate student funded by the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. We would to thank Florian de Waziers for his technical assistance and Antoinette Wolfe for the language revision.

References

1. Springer CJ, Niculescu-Duvaz I. Prodrug-activating systems in suicide gene therapy. *J Clin Invest* 2000; 105: 1161-7.
2. Chen L, Waxman DJ. Cytochrome P450 gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT) for cancer. *Curr Pharm Des* 2002; 8: 1405-16.
3. Altaner C. Prodrug cancer gene therapy. *Cancer Lett* 2008; 270: 191-201.
4. Lohr M, Hoffmeyer A, Kroger J, Freund M, Hain J, Holle A, et al. Microencapsulated cell-mediated treatment of inoperable pancreatic carcinoma. *Lancet* 2001; 357: 1591-2.
5. Löhr M, Kröger J, Hoffmeyer A, Freund M, Hain J, Holle A, et al. Safety, feasibility and clinical benefit of localized chemotherapy using microencapsulated cells for inoperable pancreatic carcinoma in phase I/II trial. *Cancer Therapy* 2003; 1: 121-31.
6. Braybrooke JP, Slade A, Deplanque G, Harrop R, Madhusudan S, Forster MD, et al. Phase I study of MetXia-P450 gene therapy and oral cyclophosphamide for patients with advanced breast cancer or melanoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1512-20.
7. Chang TK, Weber GF, Crespi CL, Waxman DJ. Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochromes P-450 2B and 3A in human liver microsomes. *Cancer Res* 1993; 53: 5629-37.
8. Chen CS, Lin JT, Goss KA, He YA, Halpert JR, Waxman DJ. Activation of the anticancer prodrugs cyclophosphamide and ifosfamide: identification of cytochrome P450 2B enzymes and site-specific mutants with improved enzyme kinetics. *Mol Pharmacol* 2004; 65: 1278-85.
9. Nguyen TA, Tychopoulos M, Bichat F, Zimmermann C, Flinois JP, Diry M, et al. Improvement of cyclophosphamide activation by CYP2B6 mutants: from in silico to ex vivo. *Mol Pharmacol* 2008; 73: 1122-33.
10. Yu LJ, Matias J, Scudiero DA, Hite KM, Monks A, Sausville EA, et al. P450 enzyme expression patterns in the NCI human tumor cell line panel. *Drug Metab Dispos* 2001; 29: 304-12.
11. Fitzsimmons SA, Workman P, Grever M, Paull K, Camalier R, Lewis AD. Reductase enzyme expression across the National Cancer Institute Tumor cell line panel: correlation with sensitivity to mitomycin C and EO9. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 259-69.
12. Tychopoulos M, Corcos L, Genne P, Beaune P, de Waziers I. A virus-directed enzyme prodrug therapy (VDEPT) strategy for lung cancer using a CYP2B6/NADPH-cytochrome P450 reductase fusion protein. *Cancer Gene Ther* 2005; 12: 497-508.
13. Argos P. An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion. *J Mol Biol* 1990; 211: 943-58.
14. Galluzzi L, Senovilla L, Zitvogel L, Kroemer G. The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11: 215-33.
15. Pere H, Tanchot C, Bayry J, Terme M, Taieb J, Badoual C, et al. Comprehensive analysis of current approaches to inhibit regulatory T cells in cancer. *Oncoimmunology* 2012; 1: 326-33.
16. Apetoh L, Tesniere A, Ghiringhelli F, Kroemer G, Zitvogel L. Molecular interactions between dying tumor cells and the innate immune system determine the efficacy of conventional anticancer therapies. *Cancer Res* 2008; 68: 4026-30.
17. Gervot L, Rochat B, Gautier JC, Bohnenstengel F, Kroemer H, de Berardinis V, et al. Human CYP2B6: expression, inducibility and catalytic activities. *Pharmacogenetics* 1999; 9: 295-306.

18. Truan G, Cullin C, Reisdorf P, Urban P, Pompon D. Enhanced in vivo monooxygenase activities of mammalian P450s in engineered yeast cells producing high levels of NADPH-P450 reductase and human cytochrome b5. *Gene* 1993; 125: 49-55.
19. Schoene B, Fleischmann RA, Remmer H, von Oldershausen HF. Determination of drug metabolizing enzymes in needle biopsies of human liver. *Eur J Clin Pharmacol* 1972; 4: 65-73.
20. Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, Levitsky HI, August JT, Pardoll DM, et al. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res* 1996; 56: 21-6.
21. Dupuy FP, Mouly E, Mesel-Lemoine M, Morel C, Abriol J, Cherai M, et al. Lentiviral transduction of human hematopoietic cells by HIV-1- and SIV-based vectors containing a bicistronic cassette driven by various internal promoters. *J Gene Med* 2005; 7: 1158-71.
22. Belloc C, Baird S, Cosme J, Lecoecur S, Gautier JC, Challine D, et al. Human cytochromes P450 expressed in *Escherichia coli*: production of specific antibodies. *Toxicology* 1996; 106: 207-19.
23. Adotevi O, Vingert B, Freyburger L, Shrikant P, Lone YC, Quintin-Colonna F, et al. B subunit of Shiga toxin-based vaccines synergize with alpha-galactosylceramide to break tolerance against self antigen and elicit antiviral immunity. *J Immunol* 2007; 179: 3371-9.
24. Vingert B, Adotevi O, Patin D, Jung S, Shrikant P, Freyburger L, et al. The Shiga toxin B-subunit targets antigen in vivo to dendritic cells and elicits anti-tumor immunity. *Eur J Immunol* 2006; 36: 1124-35.
25. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc* 2008; 83: 584-94.
26. Gay SC, Shah MB, Talakad JC, Maekawa K, Roberts AG, Wilderman PR, et al. Crystal structure of a cytochrome P450 2B6 genetic variant in complex with the inhibitor 4-(4-chlorophenyl)imidazole at 2.0-A resolution. *Mol Pharmacol* 2010; 77: 529-38.
27. Shiraki H, Guengerich FP. Turnover of membrane proteins: kinetics of induction and degradation of seven forms of rat liver microsomal cytochrome P-450, NADPH-cytochrome P-450 reductase, and epoxide hydrolase. *Arch Biochem Biophys* 1984; 235: 86-96.
28. Yakkundi A, McErlane V, Murray M, McCarthy HO, Ward C, Hughes CM, et al. Tumor-selective drug activation: a GDEPT approach utilizing cytochrome P450 1A1 and AQ4N. *Cancer Gene Ther* 2006; 13: 598-605.
29. Vaupel P, Thews O, Hoeckel M. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med Oncol* 2001; 18: 243-59.
30. Williams KJ, Cowen RL, Brown LM, Chinje EC, Jaffar M, Stratford IJ. Hypoxia in tumors: molecular targets for anti-cancer therapeutics. *Adv Enzyme Regul* 2004; 44: 93-108.
31. Apetoh L, Mignot G, Panaretakis T, Kroemer G, Zitvogel L. Immunogenicity of anthracyclines: moving towards more personalized medicine. *Trends Mol Med* 2008; 14: 141-51.
32. Combest AJ, Roberts PJ, Dillon PM, Sandison K, Hanna SK, Ross C, et al. Genetically engineered cancer models, but not xenografts, faithfully predict anticancer drug exposure in melanoma tumors. *Oncologist* 2012; 17: 1303-16.
33. Huszthy PC, Girolglou T, Tsinkalovsky O, Euskirchen P, Skaftnesmo KO, Bjerkvig R, et al. Remission of invasive, cancer stem-like glioblastoma xenografts using lentiviral vector-mediated suicide gene therapy. *PLoS One* 2009; 4: e6314.

34. Petrigliano FA, Virk MS, Liu N, Sugiyama O, Yu D, Lieberman JR. Targeting of prostate cancer cells by a cytotoxic lentiviral vector containing a prostate stem cell antigen (PSCA) promoter. *Prostate* 2009; 69: 1422-34.
35. Neschadim A, Wang JC, Lavie A, Medin JA. Bystander killing of malignant cells via the delivery of engineered thymidine-active deoxycytidine kinase for suicide gene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther* 2012; 19: 320-7.
36. Escors D, Breckpot K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2010; 58: 107-19.
37. Rozados VR, Mainetti LE, Rico MJ, Zacarias Fluck MF, Matar P, Scharovsky OG. The immune response and the therapeutic effect of metronomic chemotherapy with cyclophosphamide. *Oncol Res* 2010; 18: 601-5.
38. Doloff JC, Waxman DJ. VEGF receptor inhibitors block the ability of metronomically dosed cyclophosphamide to activate innate immunity-induced tumor regression. *Cancer Res* 2012; 72: 1103-15.
39. Finger JH, Smith CM, Hayamizu TF, McCright IJ, Eppig JT, Kadin JA, et al. The mouse Gene Expression Database (GXD): 2011 update. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: D835-41.
40. Voelcker G, Wagner T, Wientzek C, Hohorst HJ. Pharmacokinetics of "activated" cyclophosphamide and therapeutic efficacies. *Cancer* 1984; 54: 1179-86.
41. Vernejoul F, Ghenassia L, Souque A, Lulka H, Drocourt D, Cordelier P, et al. Gene therapy based on gemcitabine chemosensitization suppresses pancreatic tumor growth. *Mol Ther* 2006; 14: 758-67.
42. Sorscher EJ, Hong JS, Allan PW, Waud WR, Parker WB. In vivo antitumor activity of intratumoral fludarabine phosphate in refractory tumors expressing E. coli purine nucleoside phosphorylase. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012; 70: 321-9.
43. Barbon CM, Yang M, Wands GD, Ramesh R, Slusher BS, Hedley ML, et al. Consecutive low doses of cyclophosphamide preferentially target Tregs and potentiate T cell responses induced by DNA PLG microparticle immunization. *Cell Immunol* 2010; 262: 150-61.
44. Lutsiak ME, Semnani RT, De Pascalis R, Kashmiri SV, Schlom J, Sabzevari H. Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood* 2005; 105: 2862-8.
45. Gasparoto TH, de Souza Malaspina TS, Benevides L, de Melo EJ, Jr., Costa MR, Damante JH, et al. Patients with oral squamous cell carcinoma are characterized by increased frequency of suppressive regulatory T cells in the blood and tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother* 2010; 59: 819-28.
46. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 295-307.
47. Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, Martin F, et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56: 641-8.
48. Pere H, Montier Y, Bayry J, Quintin-Colonna F, Merillon N, Dransart E, et al. A CCR4 antagonist combined with vaccines induces antigen-specific CD8+ T cells and tumor immunity against self antigens. *Blood* 2011; 118: 4853-62.
49. Lee EX, Lam DH, Wu C, Yang J, Tham CK, Ng WH, et al. Glioma gene therapy using induced pluripotent stem cell derived neural stem cells. *Mol Pharm* 2011; 8: 1515-24.
50. Cihova M, Altanerova V, Altaner C. Stem cell based cancer gene therapy. *Mol Pharm* 2011; 8: 1480-7.

Table and figure legends

Table 1. CPA 4-hydroxylation and NADPH cytochrome P450 reductase (RED) activities in yeast microsomes expressing wild type cytochrome P450 2B6 (CYP2B6wt), triple mutant CYP2B6 (CYP2B6TM) and CYP2B6TM-RED fusion proteins with different linkers.

The kinetic constants of CPA hydroxylase were determined by a non-linear regression with fifteen substrate concentrations from 0 to 25 mM. RED activity was assayed by the NADPH-dependent reduction of cytochrome c (12). Yeast RED activity was measured in yeast microsomes expressing CYP2B6wt and CYP2B6TM (324.7 nmol/min/mg of microsomal protein) and was deducted from RED activity measured in yeast microsomes expressing CYP2B6TM-RED fusion proteins to estimate the RED activity only due to the RED part of the fusion protein. Data shown were based on duplicate determinations for each data point.

* constructs used to produce recombinant lentivirus.

Table 2. CPA 4-hydroxylase and RED activities in microsomes of A549 clones expressing CYP2B6TM-RED fusion proteins with different linkers.

CPA 4-OH hydroxylase was determined with 20 mM of CPA as substrate (9). The kinetic constants of RED activity were determined by a nonlinear regression with 15 substrate concentrations of cytochrome c as electron acceptor (0.4 to 200 μ M) or of NADPH as electron donor (2 to 150 μ M). Data shown were based on duplicate determinations for each data point.

CPA hydroxylase was not detectable in microsomes of uninfected A549 cells and RED activity in microsomes of A549 cells, using cytochrome c as substrate, was 14.2 ± 2.3 nmol/min/mg of microsomal protein (12).

Figure 1: IC₅₀ values of A549 CYP2B6TM-RED clones (3Ser+Thr, 5Ser+Thr or 7Ser+Thr), A549 cells expressing CYP2B6wt-RED, and TC1-Luc2 cells expressing CYP2B6TM-RED (3Ser+Thr), after 48 hours of cyclophosphamide (CPA) treatment (0-3 mM).

The concentration at which 50% cytotoxicity (IC₅₀, mM) was achieved was determined from MTS tests based on four independent experiments in triplicate; the error bars represent the standard deviation.

* $P \leq 0.01$ and *** $P \leq 0.0001$

Figure 2: Cyclophosphamide (CPA) treatment of C57Bl/6 mice with tumors resulting from TC1-Luc2 cells with or without CYP2B6TM-RED (3Ser+Thr) expression (animal model 1) or with tumors composed of 100% of TC1-Luc2 CYP2B6TM-RED (3Ser+Thr) cells or of 25% of TC1-Luc2 CYP2B6TM-RED (3Ser+Thr) cells and 75% of uninfected (UI) TC1-Luc2 cells (Mix) (animal model 2)

A) 5.10^5 UI TC-Luc2 cells (black line) or TC1-Luc2 CYP2B6TM-RED (3Ser+Thr) cells (red line) were injected subcutaneously into the left flank of mice. When tumor volume reached 500 mm³, one group of mice (solid line) received CPA 140 mg/Kg (4 injections indicated by red arrows) and the other did not (dotted line). Tumor volumes were measured using a Vernier caliper twice a week and expressed as volume (mm³) = (L*l²)/2.

B) TC1-Luc2 CYP2B6TM-RED (3Ser+Thr) tumor cells were injected subcutaneously to 10-week-old-female C57Bl/6 mice. When tumor volume reached nearly 500 mm³ (day 13 after cell inoculation), one group of mice received intraperitoneal CPA 140 mg/Kg on days 13, 20, 27 and 34 and the other group received no CPA. For luminescence analysis, 200 μ l of luciferin 33 mM diluted in PBS was injected intraperitoneally and luminescence was detected 20 minutes later,

after isoflurane anesthesia, using a Biospace Photon Imager camera. Photos from three treated mice taken on days 4, 14, 25, 28, 35, 63 after tumor cell inoculation were evaluated using image analysis software.

C) 5.10^5 TC1 Luc2 CYP2B6TM-RED (3Ser+Thr) cells (red line) or a mix of 25% TC1-Luc2 CYP2B6TM-RED (3Ser+Thr) cells and 75% UI TC1-Luc2 cells (Mix, blue line) were injected subcutaneously into the left flank of mice. When tumor volume reached 500 mm^3 , one group of mice (solid line) received CPA 140 mg/Kg intraperitoneally (5 injections indicated by red arrows). The other mice received no CPA (dotted line) Tumor volumes were measured using a Vernier caliper twice a week and expressed as volume (mm^3) = $(L \times l^2) / 2$.

Figure 3: Effects of rechallenge with uninfected (UI) TC1 Luc2 in surviving mice from animal model 1

One month after the last CPA injection on day 63, $2.5.10^5$ UI TC1 Luc2 cells were injected subcutaneously into the right flank of the surviving mice and of same-age control mice.

A) Tumor volumes were measured until day 83 (control mice) or day 88 (surviving mice) using a Vernier caliper, twice a week, and expressed as volume (mm^3) = $(L \times l^2) / 2$. Individual results are presented for surviving mice (orange dotted lines, numbered 1 to 5), whereas for the control mice mean tumor volume is shown (black dotted line).

B) Luminescence photographs from 3 rechallenged surviving mice (#1, #2, and #3) on days 4, 7, 17, and 20 after tumor cell rechallenge (days 67, 70, 80, and 83 after initial cell inoculation, respectively) obtained using a Biospace Photon Imager camera and evaluated using image analysis software.

Figure 4: Immune response analysis after uninfected (UI) TC1-Luc2 rechallenge

The anti-E7₄₉₋₅₇CD8⁺T cell response was measured using tetramer (A, B) and EliSpot (C) assays

A) The tetramer assay was performed on spleens removed on day 88 from surviving rechallenged mice (animal model 1: primary graft with 100% LV-CYP2B6TM-RED cells). Mice #1, #3, and #5 were free of tumor after rechallenge.

B) Tetramer assay in mouse #1 free of tumor. For each experiment an irrelevant tetramer was included.

C) EliSpot assay performed on spleens of rechallenged surviving mice previously inoculated with a mix of 25% TC1-Luc2 CYP2B6TM-RED and 75% UI TC1-Luc 2 cells (animal model 2). Mice #1 and #4 remained free of tumor after rechallenge.

Table 1. CPA 4-hydroxylation and NADPH cytochrome P450 reductase (RED) activities in yeast microsomes expressing wild type cytochrome P450 2B6 (CYP2B6wt), triple mutant CYP2B6 (CYP2B6TM) and CYP2B6TM-RED fusion proteins with different linkers.

	4-OH CPA hydroxylase activity			NADPH cytochrome P450 reductase (RED)	
	V_{max}	K_m	V_{max}/K_m	nmol/min/mg of microsomal protein	
	nmol 4-OH CPA /min/nmol CYP	μM	m		
CYP2B6 wt	62.5 ± 3.5	4.9 ± 0.9	12.7	324.7	
CYP2B6TM	105.5 ± 2.1	1.05 ± 0.09	100.5	(yeast reductase activity)	
CYP2B6TM-RED with different linkers				total	without yeast reductase activity
1 Ser + 1Thr	98.9 ± 1.8	1.31 ± 0.10	75.4	666.6	342
2 Ser	88.0 ± 2.8	1.10 ± 0.15	80	396.8	72.1
2 Ser + 1Thr	92.3 ± 1.4	1.14 ± 0.08	81	669.6	344.9
3 Ser + 1Thr*	114.5 ± 1.8	1.1 ± 0.07	104.1	977.5	652.8
4 Ser + 1Thr	85.2 ± 0.9	1.11 ± 0.05	76.8	423.3	98.6
5 Ser + 1Thr*	108.5 ± 2.0	0.89 ± 0.08	121.9	616.4	291.7
6 Ser + 1Thr	94.4 ± 3.5	0.97 ± 0.16	92.3	638.6	313.9
7 Ser + 1Thr*	95.1 ± 2.2	1.04 ± 0.11	91.5	444.5	119.8

Table 2. CPA 4-hydroxylase and RED activities in microsomes of A549 clones expressing CYP2B6TM-RED fusion proteins with different linkers.

Substrates	NADPH cytochrome P450 reductase (RED)						4-OH CPA hydroxylase
	Cytochrome c			NADPH			
	V_{max}	K_m	V_{max}/K_m	V_{max}	K_m	V_{max}/K_m	
	nmol/min/mg of microsomal protein	μM		nmol/min/mg of microsomal protein	μM		nmol 4-OH CPA/min /mg microsomal protein
A549 clones							
CYP2B6 TM -RED (linker 3 Ser + 1 Thr)	64.6 ± 3.0	43.6 ± 5.6	1.48	76.4 ± 3.8	25.3 ± 3.7	3.0	3.03
CYP2B6 TM -RED (linker 5 Ser + 1 Thr)	35.3 ± 1.8	55.3 ± 7.0	0.64	29.5 ± 1.7	19.8 ± 3.1	1.5	2.5
CYP2B6 TM -RED (linker 7 Ser + 1 Thr)	100.0 ± 5.5	110.8 ± 12.0	0.9	54.7 ± 6.8	54.7 ± 6.8	1.4	0.59

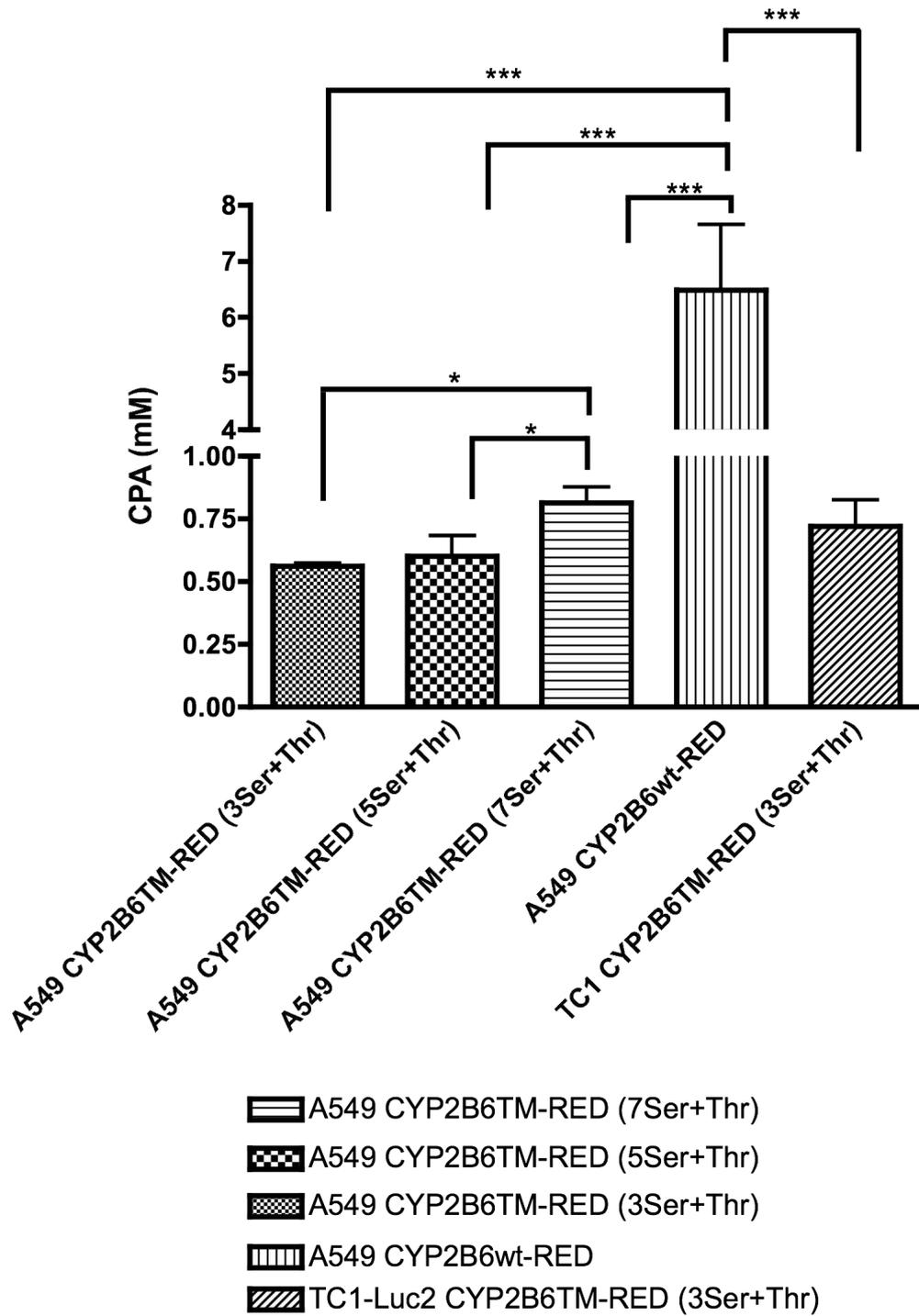
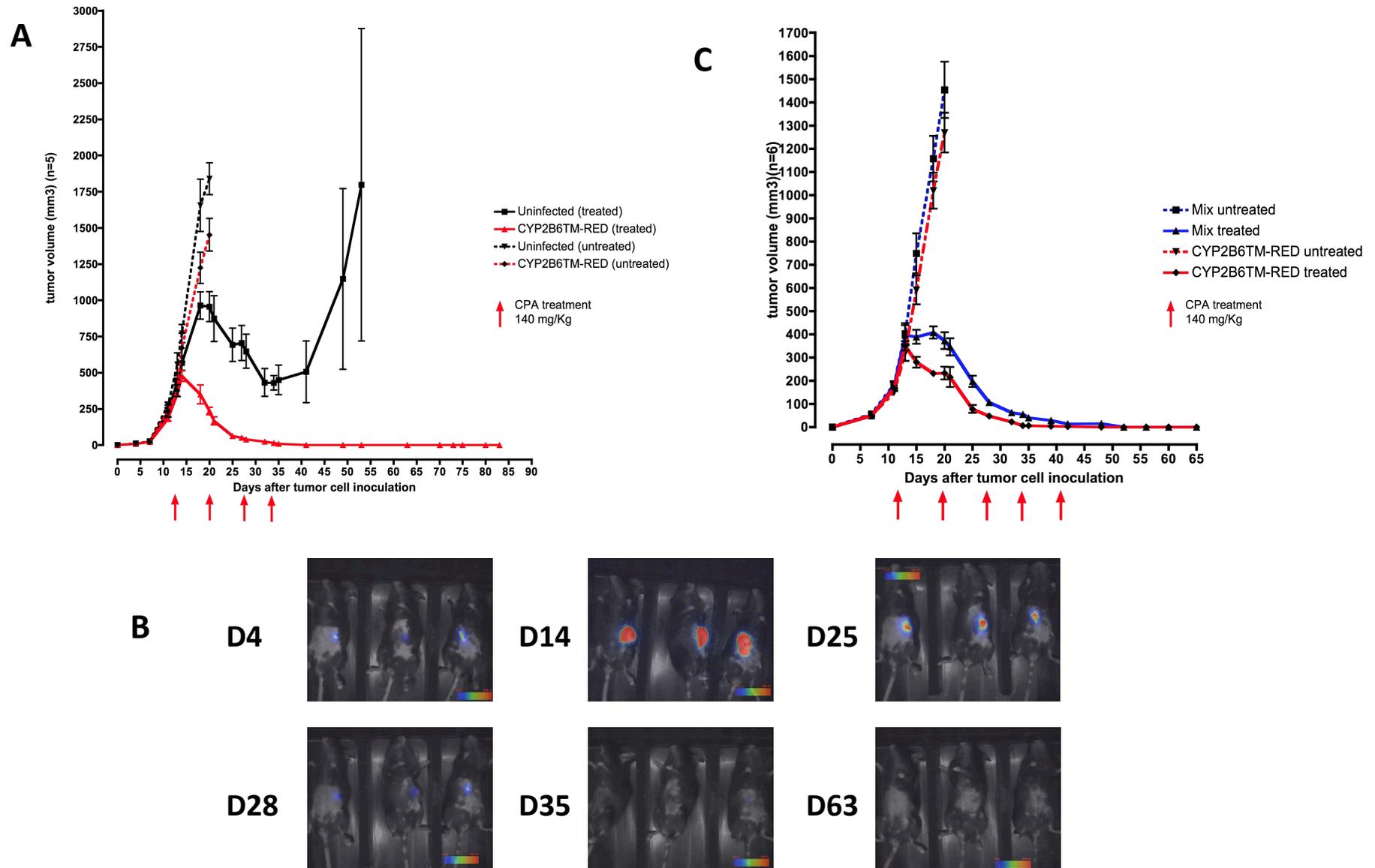


Figure 1: IC₅₀ values of A549 CYP2B6TM-RED clones (3Ser+Thr, 5Ser+Thr or 7Ser+Thr), A549 cells expressing CYP2B6wt-RED, and TC1-Luc2 cells expressing CYP2B6TM-RED (3Ser+Thr), after 48 hours of cyclophosphamide (CPA) treatment (0-3 mM).

Figure 2: Cyclophosphamide (CPA) treatment of C57Bl/6 mice with tumors resulting from TC1-Luc2 cells with or without CYP2B6TM-RED (3Ser+Thr) expression (animal model 1) or with tumors composed of 100% of TC1-Luc2 CYP2B6TM-RED (3Ser+Thr) cells or of 25% of TC1-Luc2 CYP2B6TM-RED (3Ser+Thr) cells and 75% of uninfected (UI) TC1-Luc2 cells (Mix) (animal model 2)



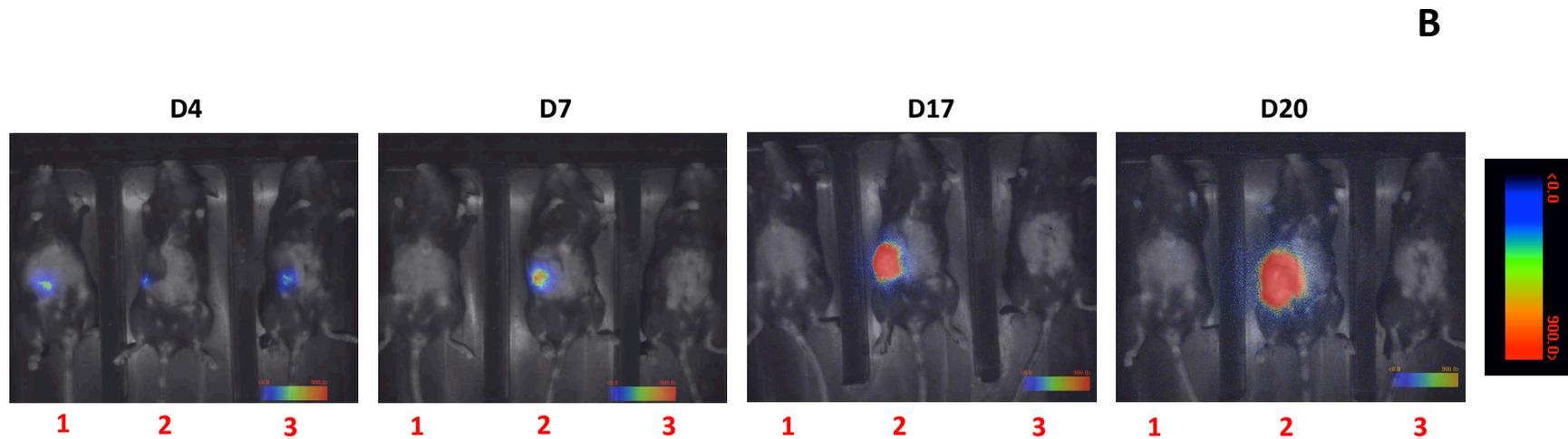
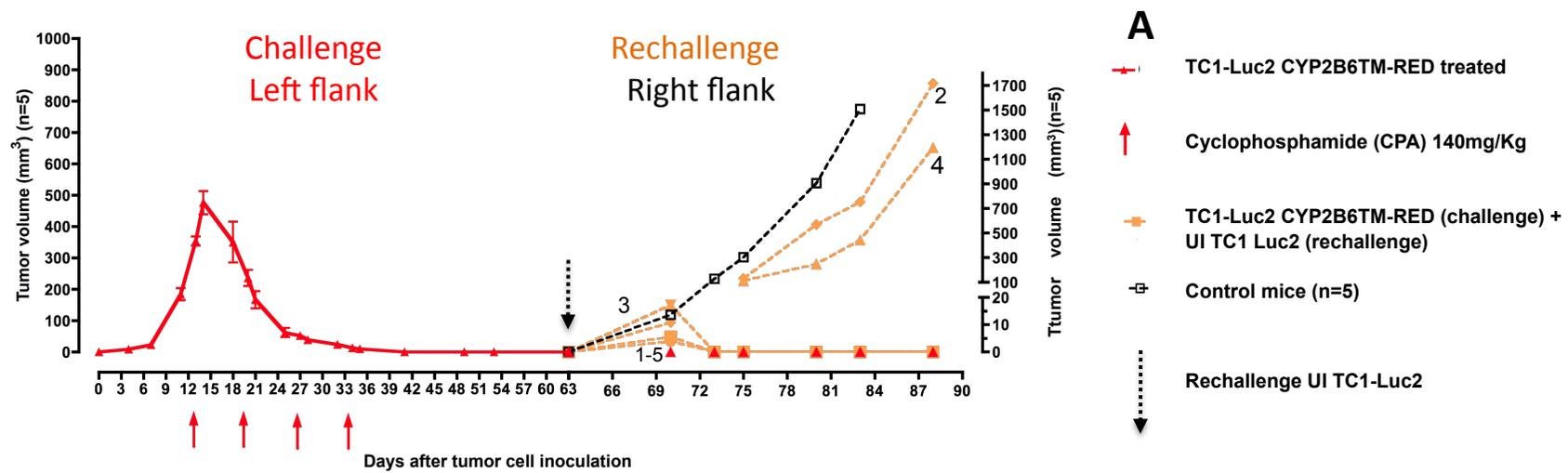


Figure 3: Effects of rechallenge with uninfected (UI) TC1 Luc2 in surviving mice from animal model 1

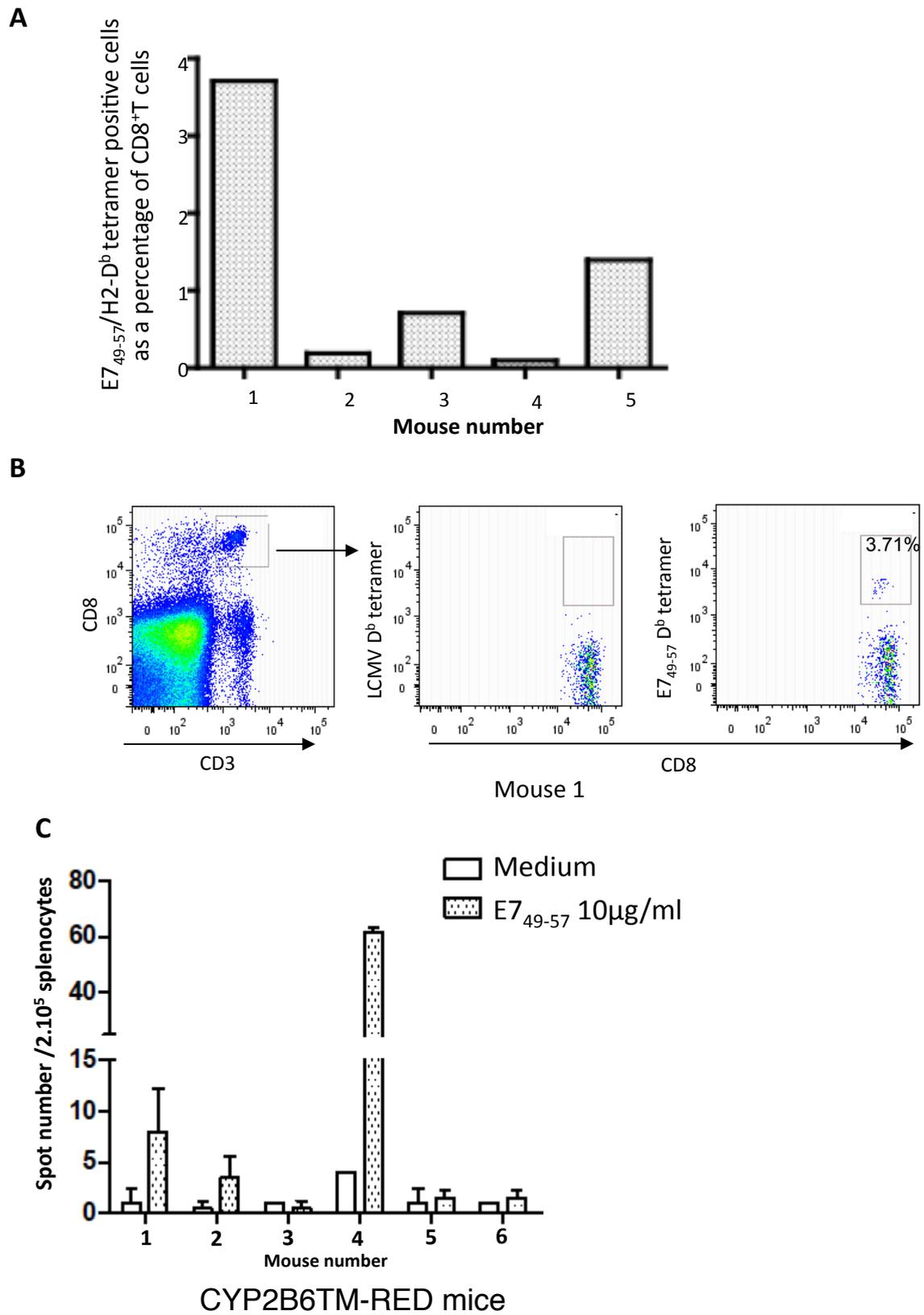


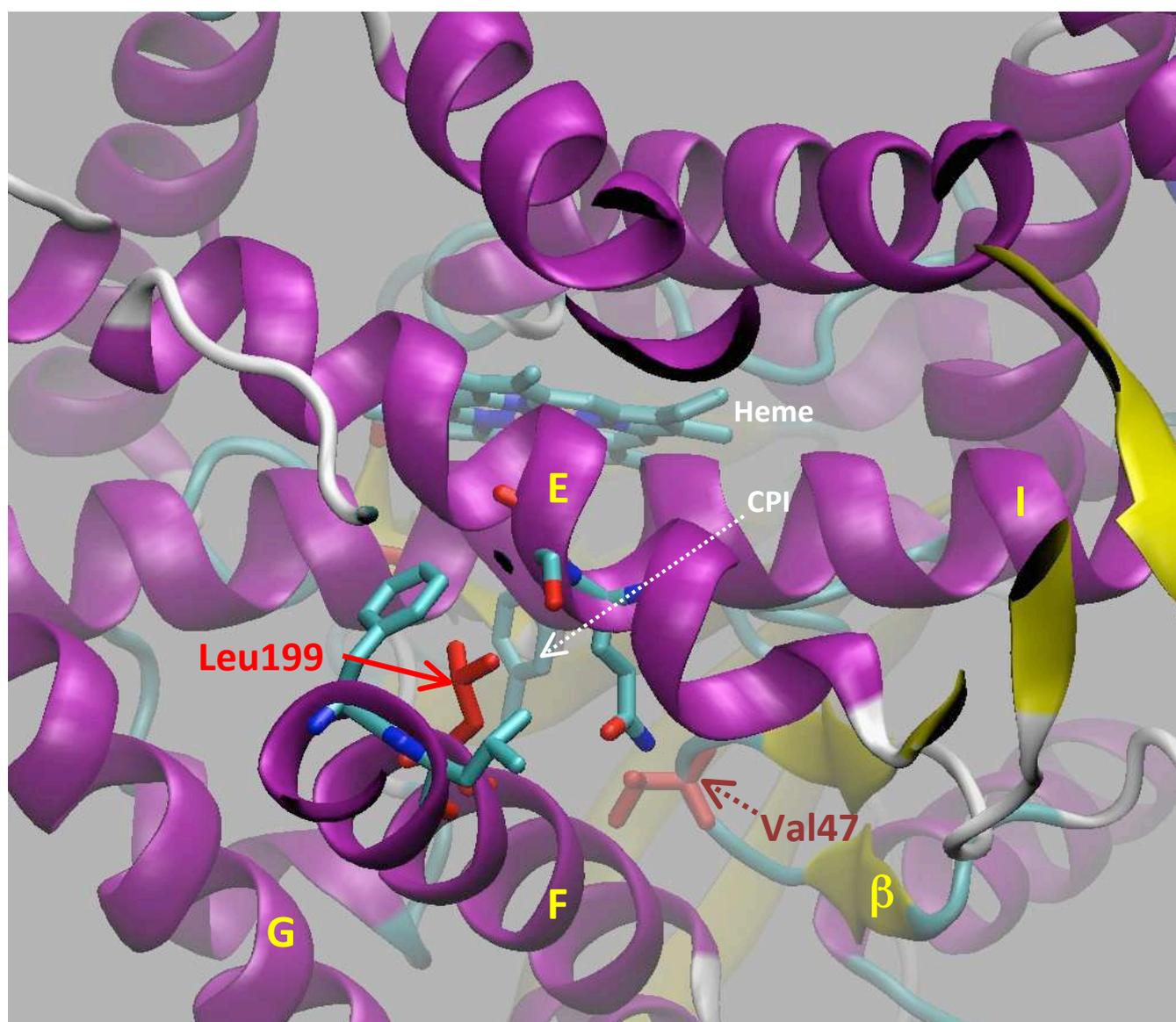
Figure 4: Immune response analysis after uninfected (UI) TC1-Luc2 rechallenge

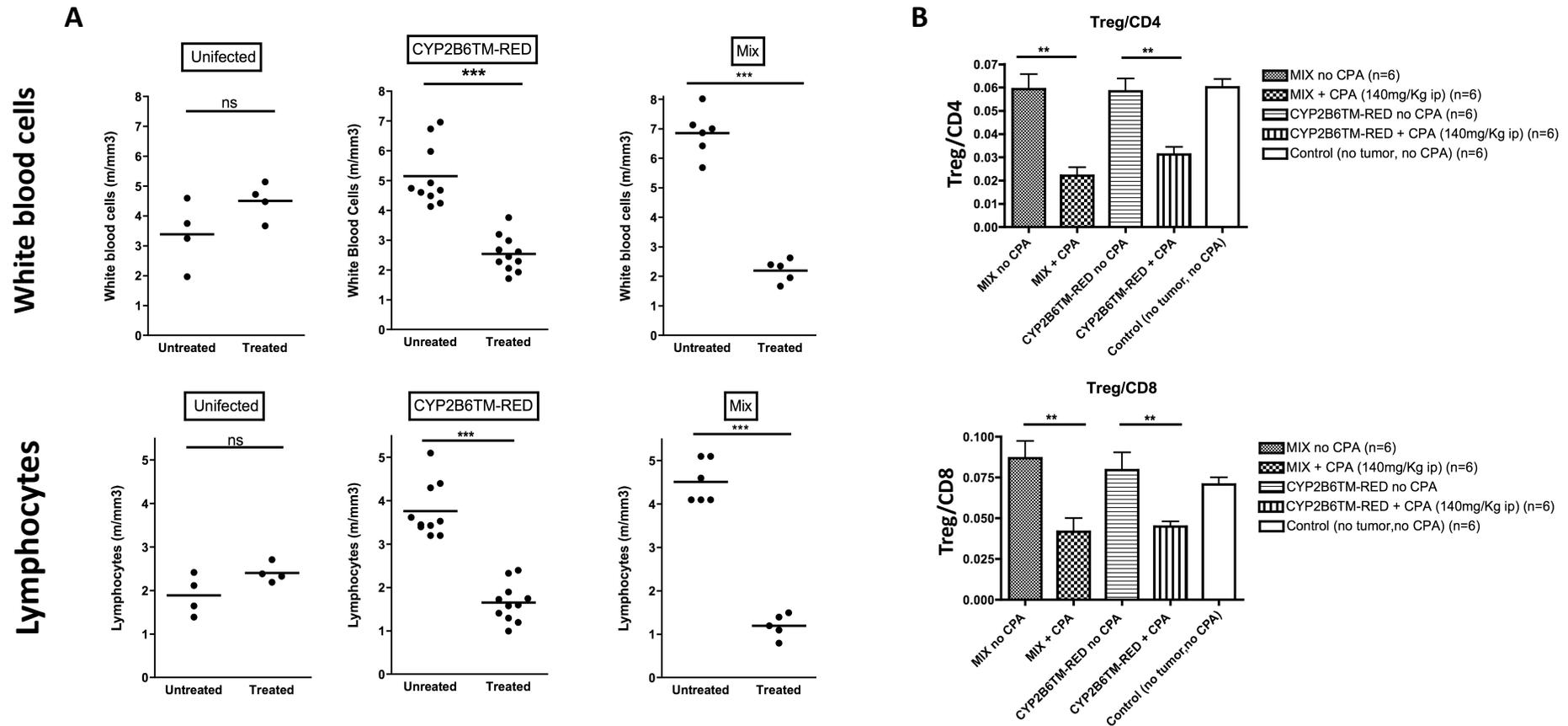
Supplemental Figure 1

Wild-type CYP 2B6 crystal structure; 3IBD pdb code, with 4-(4-chlorophenyl)-imidazole (CPI) bound.

Structural view showing E and F helices in the foreground, with focus on residues surrounding residue 199.

Protein is represented in new cartoon mode. Mutated residue 477 is represented in red (foreground) and mutated residue 199 in vermillion thick lines. Heme and CPI are represented in thick lines (licorice) with atom type coloring. Few secondary structure elements are marked in yellow.





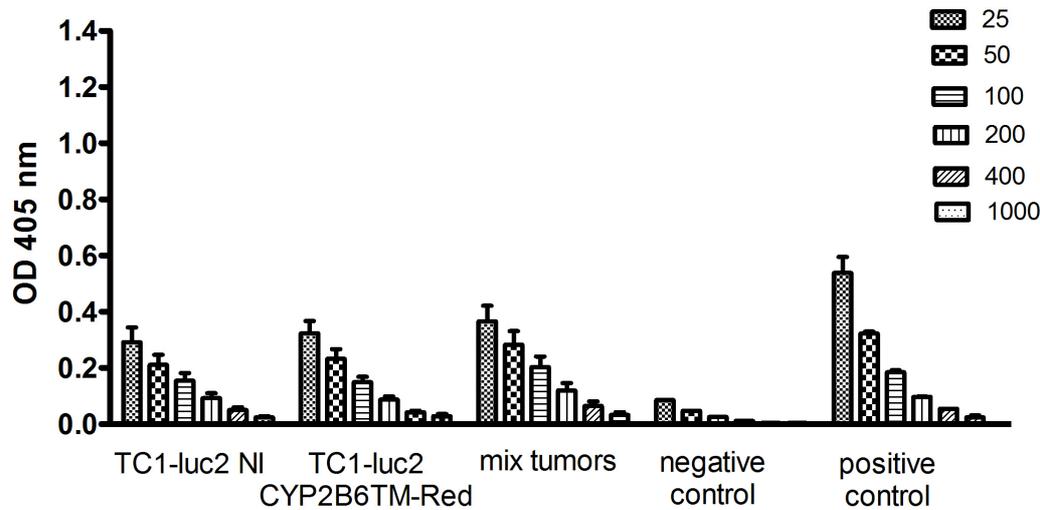
Supplemental figure 2: Blood sample analysis of treated and untreated mice 6 days after the first injection of 140 mg/Kg of cyclophosphamide (CPA)

Six days after the first CPA injection in treated mice or the corresponding day in untreated mice, blood samples from the retro-orbital vein of uninfected (UI) TC1-Luc2 mice (animal model 1, n=5 per group), CYP2B6TM-RED mice (animal model 1 + animal model 2, n=11 per group) and Mix mice (animal model 2, n=6 per group) were collected into EDTA sample collectors. Control blood samples were collected from same-age tumor-free untreated mice.

A) Total blood was analyzed using an MS9-5 robot (Melet Schloesing laboratories, Osny, France) to assess white blood cell and lymphocyte counts (10^3 cells/ μ L), which were represented in a t-Test plot.

B) Tregs, CD4⁺ T cells, and CD8⁺ T cells were studied by FACS, as previously described (44) on the same blood samples from controls (n=6), CYP2B6TM-RED mice (animal model 2, n=6 per group), and Mix mice (animal model 2, n=6 per group). The FACS data were used to determine the Treg/CD4 and Treg/CD8 ratios.

** $P \leq 0.001$, *** $P \leq 0.0001$



Supplemental Figure 3: B cell response analysis after TC1-Luc2 UI rechallenge

ELISA was performed with sera used at different dilutions (1/25 - 1/1000) as indicated and obtained from rechallenged surviving mice which were previously inoculated with either fully transduced TC1-luc2 CYP2B6TM-RED or a mix of 25% TC1-luc2 CYP2B6TM-RED and 75% UI TC1-luc2 cells (animal model 2). Sera were tested for anti-E7 specific antibodies (IgM + IgG) using an ELISA, as follows: Medisorp 96-well microtiter plates (Nunc, Denmark) were incubated at 4°C overnight with 1 µg/mL of HPV-16 E7 protein (ProteinX Lab, San Diego, CA, USA) in 100 µL coating carbonate buffer (50 mmol/L pH 9.6; Sigma Aldrich, Saint-Louis, MI, USA). Reactions were blocked with PBS 0.1% Tween-20, (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France), 1% BSA (Sigma-Aldrich) at room temperature for 1 hour. Serial dilutions (1/25 - 1/1000) of serum (100 µL) were added and incubated at room temperature for 2 hours. Alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgM + IgG antibodies (Mabtech, Sophia Antipolis, France) (1:1000 in PBS, 0.1% Tween-20, 1% BSA) were added and incubated at room temperature for 1 hour. *P*-nitrophenyl phosphate (Sigma-Aldrich) was added as the substrate for 30 min and the reaction was stopped with 50 µL of 2 M NaOH. Between steps, the plates were subjected to multiple washes with PBS, 0.1% Tween-20. Finally, optical density was measured at 405 nm.

The negative control was serum from tumor-free mice injected with 40 µL of PBS 4 weeks earlier. The positive control was serum from tumor-free mice obtained 4 weeks after three weekly subcutaneous vaccinations with Virus-Like Particles containing E7 (VLP-E7). Results are expressed as a mean ± SEM for 5 mice per group.

DISCUSSION

L'efficacité des gènes suicides dans le traitement des cancers est parfois remise en question car les résultats restent, pour l'instant, modérés lors des essais cliniques quelque soit le type de cancer – cible.

Les principales raisons invoquées sont : une faible activation des prodrogues par le gène suicide, un effet *bystander* limité ou nul et un faible niveau de transfert du gène suicide dans les tumeurs aboutissant de facto à une faible concentration tumorale du métabolite cytotoxique.

Ces problèmes ont été surmontés, par exemple, en améliorant l'efficacité du système enzymatique métabolisant la prodrogue.

Pour cela des mutations ont été introduites dans la séquence codante de l'enzyme, modifiant des acides aminés et augmentant l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Ce travail a notamment été mené avec la thymidine kinase 007 (Preuss et al., 2010) (Preuss et al., 2011) qui a été mutée pour améliorer l'affinité de l'enzyme pour le ganciclovir.

Pour ma part, dans ce travail de thèse, la construction du gène CYP2B6 triple mutant (CYP2B6TM) a permis d'améliorer significativement son affinité pour le CPA. Le gène CYP2B6TM, a ensuite été fusionné avec la NADPH cytochrome P450 réductase (RED) dans le but de fournir des électrons au CYP2B6TM. En effet un des problèmes qui peut se présenter est l'absence ou la faible expression de la RED dans les tumeurs (Yu et al., 2001) limitant l'activation du CPA par le transgène dans la tumeur.

Les partenaires redox des CYP sont généralement exprimés de façon indépendante, mais il existe chez certaines bactéries et champignons des systèmes dans lesquels il y a eu fusion

entre les gènes du CYP et de la Réductase. Chez l'Homme, on peut retrouver ce type de fusion avec la NO synthase (Argos, 1990). Des études stœchiométriques ont montré que les CYP se regroupaient par 6 ou 8 autour d'une NADPH CYP Réductase (Schwarz et al., 1990). La construction d'une protéine de fusion CYP-RED permet au cytochrome de ne pas être isolé sans fournisseur d'électrons et donc de réaliser sa réaction de mono-oxygénation.

Lors de la construction de ce gène de fusion, plusieurs linkers (séquences entre les deux gènes) ont été testés, variant par le nombre d'acides aminés Sérine + Thréonine. Le choix de la sérine et de la thréonine s'est fait à partir de comparaisons de séquences de protéines de fusion naturelles (Argos, 1990) qui ont montré que les meilleurs linkers étaient ceux constitués des acides aminés Thréonine, Sérine (non chargés) et Glycine (hydrophobe). D'après l'étude d'Argos et al., la longueur moyenne d'un linker est de 6,5 résidus. De plus, il est mis en évidence qu'un linker comprenant une large proportion de sérine présente l'avantage de mieux résister aux effets de la protéolyse.

Les résultats obtenus montrent que l'activité CPA – hydroxylase n'est pas significativement modifiée par l'ajout de la réductase (données obtenues sur des levures et la lignée cellulaire A549), en revanche des variations dans la taille du linker modifient l'activité réductase (données obtenues sur des levures et la lignée cellulaire A549). Une étude détaillée de la structure cristalline de la protéine de fusion pourrait nous aider à mieux comprendre les raisons de ces différences d'activité réductase.

Nous avons ensuite utilisé un vecteur lentiviral pour transférer ce gène recombinant CYP2B6TM-RED. A ce jour, il représente l'un des vecteurs viraux les plus sûrs permettant d'éviter les réactions immunitaires et inflammatoires causées par d'autres vecteurs comme par exemple les vecteurs adénoviraux ou certains AAV (due à l'existence d'une immunité contre ces virus chez les patients) (Haut et al., 2011) (Mingozzi et al., 2013). De plus,

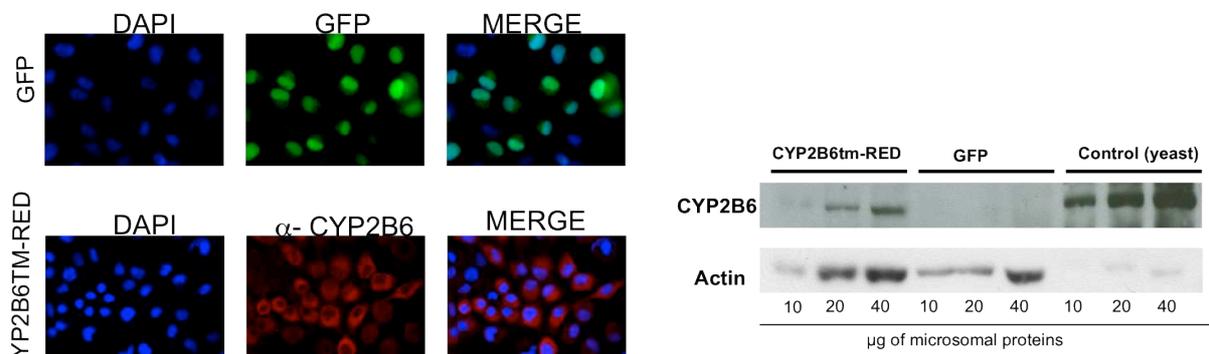
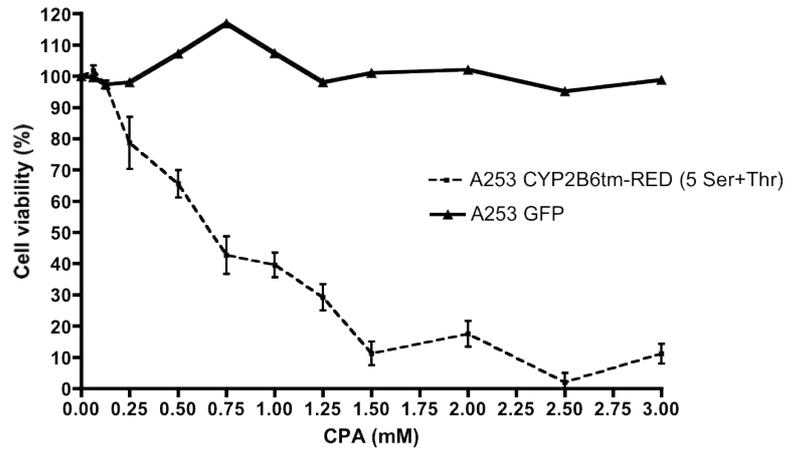


Figure 30 : Expression du CYP2B6TM-RED dans des cellules A253 et cytotoxicité du CPA

Graphique représentant la cytotoxicité du CPA dans des cellules A253 (ORL) exprimant ou non le CYP2B6TM-RED

Images d'immunofluorescence sur des cellules A253 exprimant le CYP2B6TM-RED ou la GFP

Western blot CYP2B6 sur des cellules A253 exprimant ou non le CYP2B6TM-RED

contrairement aux autres vecteurs rétroviraux, les vecteurs lentiviraux sont beaucoup moins génotoxiques (Biasco et al., 2012), limitant ainsi tout risque de mutagenèse d'insertion (Montini et al., 2009). Ils possèdent également l'avantage de transduire à la fois les cellules quiescentes et les cellules en division. Ces propriétés permettent de transduire les cellules tumorales en division ainsi que les cellules quiescentes du microenvironnement tumoral qui participent à la progression tumorale, bien que celles-ci sont pas tumorales. L'utilisation de vecteurs lentiviraux non intégratifs peut également être envisagée, ayant l'avantage de présenter beaucoup moins de risque génotoxique. Cependant il existe un inconvénient qui réside dans les difficultés de production et les faibles rendements obtenus.

L'efficacité *in vitro* de notre système a été démontrée. En effet, nous avons pu mettre en évidence qu'après expression du gène CYP2B6TM-RED dans des lignées tumorales, ces dernières devenaient très sensibles au traitement CPA. Les IC₅₀ (concentration pour laquelle 50% des cellules sont mortes) sont diminuées d'un facteur 13 dans les cellules exprimant le CYP2B6TM-RED par rapport aux cellules exprimant la protéine sauvage CYP2B6^{wt}-RED. Ces résultats ont été retrouvés sur des cellules A549 (lignée tumorale pulmonaire humaine), TC1-Luc2 (lignée tumorale pulmonaire murine), mais également sur des cellules A253 (lignée tumorale ORL humaine) (**figure 30**).

Ces études précliniques ont été complétées par des modèles animaux dont le développement a représenté la deuxième étape de l'étude.

L'utilisation de la lignée tumorale pulmonaire de souris TC1 se justifie par l'utilisation de souris immunocompétentes C57Bl/6, dont cette lignée est issue, permettant de mettre en évidence le rôle éventuel du système immunitaire dans l'efficacité de notre stratégie. En

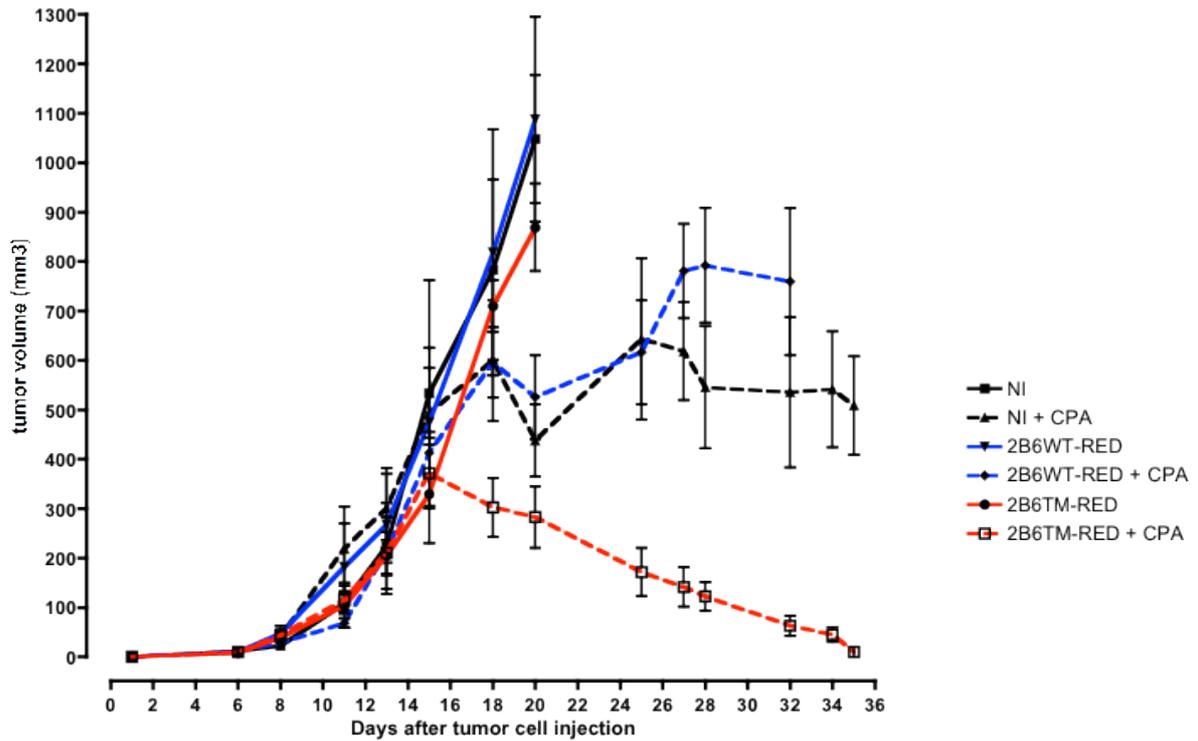


Figure 31 : Evolution du volume tumoral de souris ayant des tumeurs exprimant le CYP2B6wt-RED ou CYP2B6TM-RED traitées au CPA

CYP2B6wt-RED : CYP2B6 sauvage en fusion avec la RED

effet de plus en plus d'études mettent en évidence le rôle joué par les chimiothérapies cytotoxiques dans le déclenchement de réponses immunitaires dirigées contre la tumeur (Kroemer et al., 2013) (Vacchelli et al., 2013).

Les résultats obtenus montrent une efficacité beaucoup plus grande du traitement par le cyclophosphamide lorsque les cellules tumorales expriment la protéine de fusion CYP2B6TM-RED par rapport à des tumeurs n'exprimant aucune protéine permettant de métaboliser le CPA ou en présence d'une protéine de fusion CYP2B6^{wt}-RED (**figure 31**). Cette amélioration de la cytotoxicité tumorale a permis d'éradiquer complètement les tumeurs en utilisant des doses cumulées de CPA plus faibles que lorsque les expériences ont été menées avec d'autres CYP (par exemple CYP2B11: 560 mg de CPA dans notre stratégie contre 1540 mg pour le CYP2B11) (Jounaidi et al., 2006) (Kroger et al., 2003). La diminution du volume tumoral des souris n'exprimant pas la protéine CYP2B6TM-RED, est à mettre au compte du métabolisme hépatique du cyclophosphamide. Des études ont montré que le métabolisme hépatique du CPA chez la souris était 60 fois plus efficace que chez l'Homme (Voelcker et al., 1984). Malgré cette meilleure efficacité hépatique, les doses utilisées n'ont pas permis d'éradiquer complètement les tumeurs de ces souris, et après un temps assez bref le volume tumoral reprend sa croissance. Les effets obtenus avec l'enzyme de fusion CYP2B6^{wt}-RED montrent ici que l'activation du CPA par l'enzyme sauvage CYP2B6^{wt} n'est pas suffisante pour avoir un effet significatif sur la tumeur aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Ces résultats peuvent expliquer les conclusions de l'essai clinique MetXia[®], mené par Oxford Biosciences où ils avaient exprimé le CYP2B6^{wt} dans les tumeurs avant de traiter les patients avec du CPA. Seul un patient a vu une régression significative de sa tumeur après plusieurs cures de cyclophosphamide (Braybrooke et al., 2005). De plus, dans cet essai, seul le CYP2B6^{wt} a été utilisé sans l'ajout de RED. Or, la

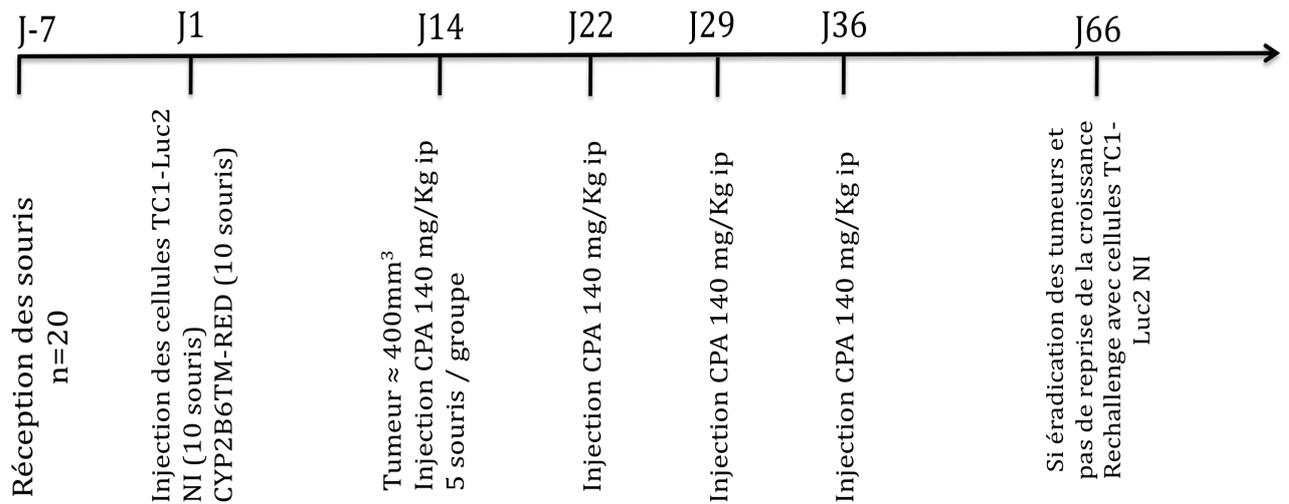


Figure 32 : Protocole et plan des expériences de traitement au CPA de souris immunodéprimées (nude)

Les souris nude développeront des tumeurs exprimant ou n'exprimant le CYP2B6TM-RED, puis elles seront traitées au CPA. Les volumes tumoraux seront analysés pendant et après traitement. Si les tumeurs sont totalement éradiquées, des cellules TC1-Luc2 NI seront réinjectées aux souris

faible expression de la RED dans les tumeurs peut être à l'origine d'une faible activité de l'enzyme et donc une moins bonne activation de la prodrogue anticancéreuse.

Après l'avoir démontré *in vitro*, nous avons également pu mettre en évidence un important effet *bystander in vivo*. En effet, avec seulement 25% de cellules capables de métaboliser le cyclophosphamide nous avons obtenu les mêmes résultats qu'avec des tumeurs possédant 100% de cellules exprimant le CYP2B6TM-RED. La réussite de toute GDEPT réside dans la présence d'un important effet *bystander* étant donné que toutes les cellules tumorales ne seront pas transduites par le vecteur et n'exprimeront pas l'enzyme. Cet effet est certainement à mettre sur le compte d'une diffusion des métabolites de proche en proche (Gunther et al., 2006), les métabolites du CPA étant capables de traverser les membranes cellulaires de manière passive : passage dans le milieu extracellulaire puis pénétration dans une autre cellule n'exprimant pas nécessairement le transgène mais pouvant être tuée par les métabolites cytotoxiques. D'autres mécanismes de passages de cellules à cellules peuvent également entrer en jeu, parmi lesquels l'implication des jonctions communicantes (**annexe III**).

L'élaboration d'un modèle de transfert de gène intratumoral *in vivo*, permettra de confirmer la pertinence et l'efficacité de la stratégie. Un premier protocole est actuellement en cours de réalisation, sur des souris C57Bl/6 immunocompétentes semblables à celles utilisées pour nos précédentes expériences (**figure 32**). Dans le détail :

- Injection de cellules TC1 (50 000 cellules) en sous-cutané (20 souris),
- Suivi de la croissance des tumeurs par la mesure du volume tumoral (pied à coulisse),
- Lorsque le volume tumoral atteint environ 400 mm³, injection du vecteur lentiviral dans la tumeur : LV CYP2B6TM-RED (10 souris) ou LV Thy1 (10

souris) (contrôle ; Thy1 permet une analyse par cytométrie en flux des niveaux d'infection), l'injection se fera de part et d'autre de la tumeur en deux points (2 * 25 µl), pour un total de 410 ng de p24 soit environ $1,13.10^8$ particules infectieuses / ml,

- 3 jours après l'injection de LV, les souris sont traitées au CPA 140 mg/Kg ip (5 souris dans chaque groupe de LV), ce cycle est répété 3 fois,
- A la fin du protocole d'injection de LV et de CPA, des tissus (foie, reins, poumon, cœur, rate) seront prélevés pour analyser l'éventuelle dissémination du vecteur hors de sa cible, et étudier les niveaux de transduction et d'expression du transgène dans la tumeur.

Ce protocole pourra être perfectionné afin d'optimiser les modalités d'administrations du vecteur lentiviral et du cyclophosphamide, ainsi que les doses, en fonction des résultats obtenus.

La meilleure affinité et le meilleur métabolisme peuvent nous laisser penser que les doses efficaces de cyclophosphamide pour avoir un effet antitumoral pourraient être diminuées à des concentrations où la toxicité systémique, non désirée, est réduite de manière drastique. Le CPA est connu pour entraîner des toxicités vésicales, mais aussi des leucopénies qui peuvent être plus ou moins sévères (Mullins and Colvin, 1975) (Hou et al., 2007). Dans notre modèle, nous avons pu voir qu'après traitement au CPA (140 mg/kg) les souris présentaient une leucopénie modérée, réversible à l'arrêt du traitement.

L'action cytotoxique du cyclophosphamide est plus spécifique de certaines populations lymphocytaires parmi lesquelles les lymphocytes T régulateurs (LT Reg) (Barbon et al., 2010). Cette De nombreuses études ont montré que les LT Reg jouaient un rôle majeur

dans le microenvironnement tumoral et que leur présence était synonyme de mauvais pronostic et de moins bonne réponse aux traitements (Salama et al., 2009) (Adotevi et al., 2010). En effet, ces lymphocytes exercent un contrôle négatif sur l'action du système immunitaire pour éviter un emballement de celui-ci. A l'état physiologique les LT Reg évitent ainsi le développement d'une immunité qui pourrait se retourner contre l'organisme et entraîner des maladies auto-immunes. Cependant dans le cas de tumeurs, en freinant l'action du système immunitaire, ils vont induire une tolérance immunitaire vis-à-vis de la tumeur et la laisser se développer sans contrôle. Le ciblage des lymphocytes T régulateurs représente aujourd'hui une cible intéressante en thérapie anticancéreuse (de Rezende et al., 2010). Dans notre stratégie, l'utilisation du cyclophosphamide nous a permis de mettre en évidence une déplétion spécifique des LT Reg. Les expériences de rechallenge ont permis de montrer le développement d'une réponse immunitaire spécifique dirigée contre un antigène tumoral. Les souris ayant une tumeur exprimant le CYP2B6TM-RED et dont la tumeur primaire a été totalement éradiquée par le traitement au CPA, ont développé une réaction immunitaire spécifique dirigée contre les protéines E7 du *papilloma* virus (exprimées dans les cellules TC1) lors de la réinjection de cellules TC1-Luc2 (n'exprimant pas le CYP2B6TM-RED).

En 1996, l'équipe de David Klatzman avait mis en évidence dans un modèle thymidine kinase – ganciclovir, des différences de réponses au traitement suivant qu'il s'agissait de souris immunocompétentes ou immunodéficientes (nude) (Gagandeep et al., 1996). Il a ainsi été montré que le traitement de métastases hépatiques de cancers colorectaux est deux fois moins efficace chez les souris immunodéficientes que chez les souris immunocompétentes après traitement HSVTK – GCV (Barba et al., 1994).

L'intervention du système immunitaire, par la stimulation ou la levée de l'inhibition, joue donc un rôle prédominant dans la destruction des cellules tumorales. Notre travail montre

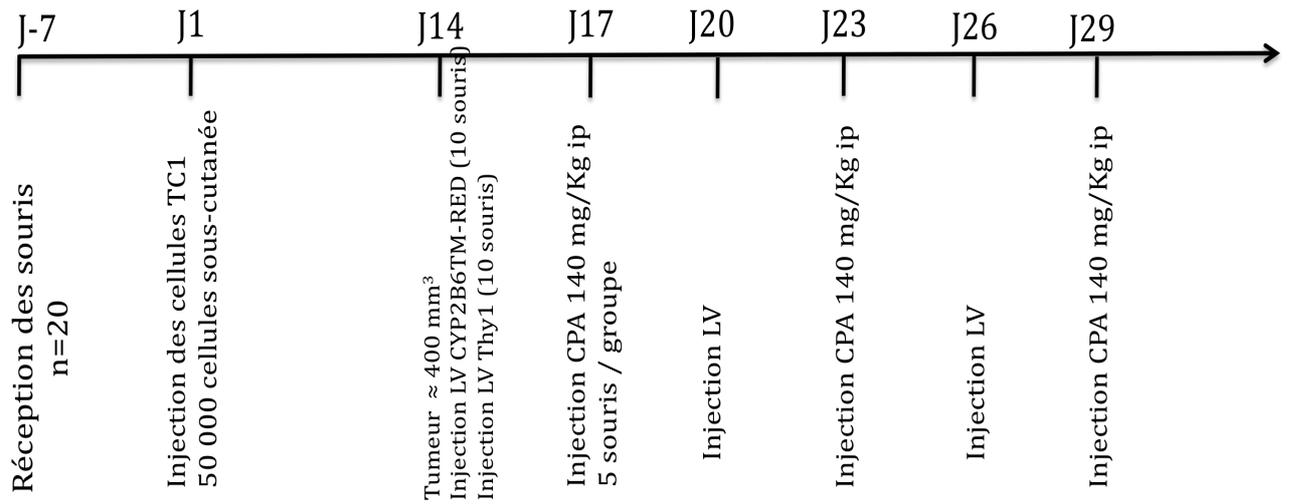


Figure 33 : Protocole et plan des expériences d’injection intratumorale du vecteur recombinant lentiviral CYP2B6TM-RED

Après développement de tumeurs sous-cutanées, les souris recevront 3 séries d’injections intratumorales de vecteur lentiviral recombinant associées à un traitement CPA.

que l'efficacité de notre stratégie GDEPT réside dans la synergie d'action entre l'action cytotoxique augmentée du cyclophosphamide, l'effet *bystander* qui en découle et aussi le développement d'une immunité antitumorale. L'avantage majeur de cette stratégie réside dans la double action de diminution drastique (d'éradication dans le cas de modèles murins) de la tumeur, et de protection à long terme en cas de récurrence ou de développement de métastases.

L'étude du développement d'une immunité antitumorale doit être approfondie pour connaître les mécanismes moléculaires mis en jeu.

Pour confirmer les effets de notre stratégie sur le système immunitaire, des modèles de souris immunodéprimées (*nude*) sont actuellement en cours de réalisation. Le protocole est identique à celui réalisé précédemment (**figure 33**). Dans le détail :

- injection de cellules TC1-Luc2 NI (10 souris) ou CYP2B6TM-RED (10 souris) en sous-cutané,
- lorsque les tumeurs atteignent un volume d'environ 400 mm³, les souris sont traitées au CPA 140 mg/Kg ip (5 souris par groupe), une injection par semaine,
- En fonction des résultats obtenus après traitement, nous envisagerons de réinjecter des cellules tumorales, et d'étudier la croissance tumorale ;

Le même protocole peut être utilisé sur des souris C57Bl/6 immunocompétentes, à qui on injecterait des anticorps dirigés contre les LT CD8 juste avant le rechallenge. Cette neutralisation des lymphocytes T CD8 permettrait de montrer l'implication de ces derniers dans la réponse immunitaire antitumorale spécifique.

Une récente étude a mis en évidence le rôle joué par le microbiote intestinal sur les effets immunitaires antitumoraux du CPA (Iida et al., 2013). Dans ce travail, les auteurs ont comparé les effets du CPA sur le système immunitaire sur des souris ayant un microbiote

Mouse mutant	Tumor induction	Phenotype	Reference
LSL-KrasG12D endogenous control	Sporadic infection of lung cells with Adeno-Cre virus	Adenomas & adenocarcinomas Long latency	(Jackson et al., 2001)
KrasG12D LA1 and LA2 in wt or p53 deficiency	Spontaneous lung tumor development due to sporadic switching of LA allele	Adenomas & adenocarcinomas A variety of tumor types	(Johnson et al., 2001)
Tet-op-KrasG12D in wt or p53 and P19Arf deficiency	CCSP-rtTA transgene, treatment with doxycyclin. Transgene directs rtTA expression in alveolar type II cells	Fast tumor growth, accelerated in p53 and Ink4A/Arf def. background.	(Fisher et al., 2001)
LSL-KrasG12D	Tamoxifen Cre-ERT2 knockins in SPC and CC10 (AT2 and Clara cells)	Adenomas & adenocarcinomas with SPC-Cre.	(Xu et al., 2012)
Beta-Actin loxGFPlox -Kras	Ad5-CMV-Cre	Adenomas & adenocarcinomas Short latency	(Meuwissen et al., 2001)
LSL-KrasG12D; p53lox/lox	Sporadic switching of lung cells with Lenti Cre virus	Accelerated tumor development. Metastasis. Role for Nkx2-1 and Hmga2	(Winslow et al., 2011)
PTENlox/lox	Clara cell specific CCSP-Cre.	No tumors	(Iwanaga et al., 2008)
LSL-KrasG12D; PTENlox/lox	Clara cell specific CCSP-Cre.	Accelerated tumor development. Metastasis	(Li et al., 2008)
LSL-KrasG12D; Lkb1lox/lox	Ad5-CMV-Cre	Strongly augmented tumor growth and metastasis both Adenocarcinomas and Squamous cell carcinomas	(Ji et al., 2007)
LSL-KrasG12Vgeo	Cre-ERT2 (RERT-ert) + Tamoxifen	Adenomas & adenocarcinomas. Not all KrasV12 expressing cells proliferate	(Guerra et al., 2003)
LL-BrafV600E	Ad5-CMV-Cre	Adenomas & rarely progress to adenocarcinoma	(Dankort et al., 2007)
Inducible-cRaf mutant	Clara and Alveolar type II cell specific expression	Only expression in alveolar type II cells gives rise to macroscopic tumors. De-induction causes reversion	(Ceteci et al., 2011)
TRE-Egfr L858R/T790M/Del exon 19 mutants	CCSP-rtTA doxycyclin inducible	Adenocarcinomas. T790M and L858R/T790M double mutant show less aggressive growth	(Politi et al., 2006; Regales et al., 2007)
Tet-op-PIK3CA H1047R; CCSP-rtTA	CCSP-rtTA doxycycline inducible	Adenocarcinoma with bronchioalveolar features	(Engelman et al. 2008)

Tableau 4 : Modèles de souris développant des tumeurs pulmonaires

intestinal normal et des souris n'ayant pas de microbiote intestinal (« germ free »). Ainsi, il a été montré que le microbiote intestinal était indispensable pour permettre la conversion des lymphocytes T CD4⁺ vers une forme T_H1 ou T_H17 productrice d'interleukine 17 (IL-17) en réponse au CPA (Viaud et al., 2013) ; population TH17 qui possède un rôle essentiel dans l'action immunitaire antitumorale. Ces effets n'ont pas été retrouvés chez les souris « germ free ». Le rôle du microbiote a été confirmé en administrant un traitement antibiotique qui a eu pour conséquence de diminuer significativement l'efficacité de l'effet antitumoral du CPA. Ces effets montrent que l'importance des interactions entre le microbiote et le CPA dans le développement d'une réponse immunitaire antitumorale efficace.

Les résultats obtenus sur les modèles animaux permettront de confirmer ou d'infirmer le rôle du système immunitaire dans l'efficacité de notre stratégie et de soumettre un manuscrit plus argumenté.

Enfin, à l'avenir il faudra prévoir des modèles de cancer pulmonaire orthotopique avec un « vrai » microenvironnement tumoral permettant de reconstituer de manière la plus fidèle possible ce que l'on retrouve chez l'Homme. Pour cela des modèles de souris transgéniques présentant des mutations caractéristiques des cancers du poumon tels que KRAS, EGFR ont été mis au point. D'autres modèles permettent l'induction d'un cancer du poumon avec par exemple l'utilisation d'un système CRE-Lox qui permet d'induire des mutations d'un gène à un moment donné. (Meuwissen and Berns, 2005) (Kwon and Berns, 2013). Des exemples sont présentés dans le tableau 4. Ces modèles présentent aujourd'hui des avantages par rapport aux modèles d'injection de cellules sous-cutanée ou même orthotopique. La suite du travail devra, pour plus de pertinence, utiliser ce genre de modèles.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les progrès réalisés dans la prise en charge et le traitement des patients atteints de cancer ont permis une amélioration importante du pronostic et de leur qualité de vie. Malheureusement la mortalité reste encore beaucoup trop élevée. De nouvelles thérapies ont été mises au point mais il reste encore beaucoup à faire. Récemment, l'effort considérable qui a été mené sur les thérapies ciblées a permis d'augmenter la durée de vie des patients permettant ainsi le développement de la médecine personnalisée (Kudo, 2011) (Kumar et al., 2012). Cependant malgré son coût élevé (Purmonen, 2011) (Ferrusi et al., 2011) (Bongers et al., 2012), des toxicités et des résistances restent un frein majeur à l'efficacité de ces traitements contre le cancer. Le développement de nouvelles thérapies est donc un impératif. L'amélioration d'anciennes stratégies de thérapies suicides dans le traitement des cancers pourraient ainsi constituer des armes dans l'arsenal thérapeutique anticancéreux. L'objectif de ce travail a consisté à tenter d'améliorer chacune des étapes de cette stratégie afin de la rendre efficace en clinique.

Transfert du gène suicide :

Comme nous avons pu le rapporter précédemment, de nombreuses équipes ont développé des stratégies de gène suicide avec plus ou moins de succès. La plupart d'entre eux se sont heurtés au problème du transfert du gène suicide (Crystal et al., 1997) (Braybrooke et al., 2005) (Nasu et al., 2007). Si dans la plupart des essais cliniques, le transgène peut être détecté par des techniques sensibles, le niveau de transduction global dans la tumeur semble malgré tout trop faible pour assurer un effet antitumoral efficace (Crystal et al., 1997) (Fillat et al., 2003) (Braybrooke et al., 2005). Pour palier ces faibles niveaux de transduction, plusieurs

pistes ont été suivies et testées : l'amélioration de l'efficacité du gène suicide ; les mutations que nous avons effectuées et l'addition de la réductase permettent d'augmenter l'affinité du CYP2B6, la production de métabolites cytotoxique et confirme la toxicité *in vitro* et *in vivo* (diminution IC50, éradication complète de la tumeur chez la souris). L'effet *bystander* est essentiel, or la plupart des prodrogues utilisées (Ganciclovir, Gemcitabine...) ont des métabolites cytotoxiques phosphorylés incapables de diffuser à travers les membranes cellulaires. Pour que ces métabolites puissent exercer un effet *bystander*, il est nécessaire d'avoir des jonctions communicantes fonctionnelles permettant leur passage d'une cellule à l'autre (**annexe III**). En revanche, dans notre système, les métabolites du CPA (4-OH-CPA) diffusent passivement limitant l'importance des jonctions communicantes (Tychopoulos et al., 2005) (**annexe III**).

Par ailleurs, des outils mis en place pour améliorer le ciblage sont présentés dans le chapitre publié dans le livre *Current Cancer Treatment – Novel beyond conventional approaches* (**annexe IV**). En effet l'utilisation de vecteurs lentiviraux représente un moyen efficace pour transférer un gène dans les cellules tumorales. Les modèles d'injection du vecteur intratumoral permettront de déterminer les concentrations optimales de vecteur à utiliser et les effets toxiques qui pourraient résulter d'une dissémination dans les tissus sains. C'est la raison pour laquelle nous nous intéressons également au développement de systèmes d'amélioration du ciblage ; ou encore l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses, (**annexe V**) qui pourrait constituer une avancée car elle permettrait de cibler à la fois les tumeurs et les métastases.

L'utilisation de vecteurs viraux semi-réplicatifs peut également être envisagée pour améliorer l'efficacité de transduction des cellules tumorales. Ces vecteurs présentent la particularité de pouvoir répliquer leur génome sans générer de particules infectieuses. Pour cela des modifications génétiques peuvent être apportées pour permettre une expression ou

une réplication du génome tissu spécifique, par exemple (Dalba et al., 2007). Ces modifications permettent ainsi une limitation et un contrôle de la réplication virale au niveau du site tumoral. Des études *in vivo* sur des souris ont permis de mettre en évidence une meilleure efficacité de transduction grâce à l'utilisation de vecteurs viraux semi-réplicatifs, comparée à l'utilisation de vecteurs viraux non réplicatifs (Solly et al., 2003) (Wang et al., 2003).

Chimiothérapie cytotoxique et réponse immunitaire :

Ce travail a montré que la GDEPT que nous avons mis en place agit sur deux aspects essentiels des thérapies anticancéreuses : la destruction des cellules tumorales par une action cytotoxique des médicaments (bioactivation, effet *bystander*) et par le développement d'une immunité antitumorale (Gagandeep et al., 1996) (Agard et al., 2001) (Kuriyama et al., 2004) (Pandha et al., 2005). Le déclenchement d'une immunité efficace, dirigée contre la tumeur, est une des clés pour éviter le développement précoce de résistances aux chimiothérapies anticancéreuses (Haynes et al., 2008) (Dhodapkar, 2013) (Zheng et al., 2013). L'utilisation d'une combinaison CYP2B6TM-RED / CPA présente un avantage par rapport à d'autres combinaisons gène suicide – prodrogue car en plus du développement d'une immunité induite par un traitement cytotoxique, le CPA de par ses propriétés va cibler les cellules immunitaires régulatrices (LT Reg) et amplifier cette réponse antitumorale.

Outre l'action connue du CPA à faible dose, qui a aussi été démontrée dans ce travail, sur les lymphocytes T régulateurs, des publications mettent en avant le pouvoir du CPA à induire une mort immunogénique (Kroemer et al., 2013).

Au cours de la mort immunogénique les cellules vont envoyer des signaux permettant d'activer le système immunitaire et de le « prévenir ». La plupart des chimiothérapies anticancéreuses cytotoxiques induisent une mort cellulaire par apoptose au cours de laquelle la cellule va exprimer des molécules qui vont permettre la phagocytose de la cellule et la présentation d'antigènes aux cellules immunitaires.

Ainsi dans notre stratégie, les réactions immunitaires développées après expression de la protéine CYP2B6TM-RED et le traitement au CPA peuvent être dûes à l'association de l'induction d'une mort immunogénique et d'une diminution des LT Reg.

Ainsi, nous recherchons actuellement si les mécanismes impliqués dans la mort immunogéniques sont effectivement déclenchés par notre stratégie. Pour cela des cellules (A549 et TC1) exprimant le CYP2B6TM-RED seront traitées à des concentrations en CPA qui induisent la mort d'environ 20 % des cellules, et les facteurs impliqués dans le processus de mort immunogénique seront étudiés : l'expression de la calréticuline (Garg et al., 2012), qui est exprimée à la surface des cellules comme signal de reconnaissance pour la phagocytose, les protéines du stress du réticulum endoplasmique (Kepp et al., 2013) et le relargage d'ATP (Martins et al., 2013). La démonstration *in vitro* d'une mort immunogénique devra être confirmée *in vivo* sur des modèles animaux.

Association avec d'autres traitements :

L'association de notre GDEPT à des vaccins thérapeutiques pourrait également être envisagée. Ces derniers s'appuient sur l'utilisation d'antigènes tumoraux fortement exprimés à la surface des cellules tumorales pour déclencher une réponse immunitaire dirigée spécifiquement contre ces antigènes. Nos résultats ont montré que notre stratégie permettait une déplétion spécifique des lymphocytes T régulateurs favorisant le développement d'une immunité antitumorale. En collaboration avec les équipes du

Professeur Eric Tartour (INSERM UMR-S 970, Hôpital Européen Georges Pompidou) et du Professeur François Lemoine (UMRS 7211 CNRS / INSERM U959, Hôpital Pitié Salpêtrière) qui développent des vaccins dirigés contre les protéines du virus du *papilloma* dans les cancers ORL (Sandoval et al., 2013) (Lescaille et al., 2013) (Nizard et al., 2013), nous pourrions envisager de développer des modèles associant nos deux stratégies.

Le CPA étant métabolisé par la partie CYP2B6TM du gène de fusion, et le fait que nous ayons de la réductase en excès, puisqu'il faut en moyenne 1 mole de RED pour 10 moles de CYP (Shiraki and Guengerich, 1984), nous laisse penser que nous pourrions tester des prodrogues activées par la RED telles que mitomycine C, tirapazamine par exemple (Schwarz et al., 1990). Ainsi, des combinaisons de ces prodrogues avec le CPA pourraient être testées, et nous pouvons faire l'hypothèse d'un effet synergique de ces médicaments associés. Des modèles animaux afin de déterminer les concentrations optimales de prodrogues à utiliser sont en cours de développement.

Autres cibles :

Avant qu'une technique de ciblage performante soit mise en place, le transfert du gène suicide pourrait s'effectuer pour les tumeurs accessibles (ORL, sein, mélanome) par injection intratumorale du lentivirus recombinant. L'objectif sera de permettre, à défaut d'une éradication complète, une diminution de la taille des tumeurs limitant les mutilations de la chirurgie de résection ; cette stratégie peut aussi être utilisée après la chirurgie. Par exemple, des études cliniques ont été menées sur des patients atteints de glioblastome qui, après chirurgie de résection, ont reçu directement dans ce qui restait de la tumeur, le vecteur HSV-tk puis le traitement au ganciclovir (Shand et al., 1999). Le but était ici d'éliminer les cellules tumorales n'ayant pas été retirées par la chirurgie ; ce qui est très

fréquent dans les glioblastomes du fait des difficultés de la résection chirurgicale et du caractère très invasif de ce cancer.

Le lymphome de Burkitt, dont le traitement principal est le CPA, peut également représenter une bonne cible (au niveau des tumeurs de la face) (**annexe II**).

Enfin, le but ultime de notre travail est le transfert de notre stratégie en clinique. Ceci nécessiterait d'une part l'implication de partenaires industriels ou académiques pour produire des lentivirus recombinants de grade clinique ; d'autre part l'implication de cancérologues cliniciens pour lesquels notre stratégie pourrait constituer une alternative en cas d'échec des traitements conventionnels. Un des autres avantages de notre combinaison est que le cyclophosphamide est une molécule ancienne dont on connaît très bien la pharmacocinétique et la pharmacodynamie. Ainsi, nous avons un recul sur les toxicités, les effets secondaires et les risques de résistances.

Un futur challenge...

PARTIE III : ANNEXES

Au cours de cette thèse des travaux complémentaires permettant de mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu dans certains phénomènes tels que l'effet *bystander* ont été étudiés. Nous avons également développé de nouvelles stratégies de ciblage et de vectorisation afin d'améliorer l'efficacité de notre stratégie gène suicide. Les résultats préliminaires sont présentés en annexes et permettent d'ouvrir de nouvelles perspectives dans l'amélioration de la GDEPT.

ANNEXE I : BREVET

Mai 2012, Patent PCT / EP2012 / 058219 : Mutant cytochrome P450 2B6 proteins and uses thereof.



(51) International Patent Classification:

C07K 14/80 (2006.01) C12N 9/00 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2012/058219

(22) International Filing Date:

4 May 2012 (04.05.2012)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

11305530.5 5 May 2011 (05.05.2011) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): **INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)** [FR/FR]; 101 rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **DE WAZIERS, Isabelle** [FR/FR]; INSERM U775 Université Paris Descartes, 45 rue des Saints Pères, F-75006 Paris (FR). **TOUATI, Walid** [FR/FR]; INSERM U775 Université Paris Descartes, 45 rue des Saints Pères, F-75006 Paris (FR). **DIRY, Monique** [FR/FR]; INSERM-UMR-S 775 Université Paris Descartes, 45 rue des Saints Pères, F-75006 Paris (FR). **FLINOIS, Jean-Pierre** [FR/FR]; UMRS 775 Université Paris Descartes, 45 rue des Saints Pères, F-75006 Paris (FR). **DANSETTE, Patrick** [FR/FR]; LCBPT, CNRS UMR8601, Université Paris Descartes, 45 rue des Saints Pères, F-75270 Paris Cedex 6 (FR). **BEAU-**

NE, Philippe [FR/FR]; UMRS 775, 45 rue des Saints Pères, F-75006 Paris (FR).

(74) Agents: **DOMENEGO, Bertrand** et al.; 2, place d'Estienne d'Orves, F-75009 Paris (FR).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))



(54) Title: MUTANT CYTOCHROME P450 2B6 PROTEINS AND USES THEREOF

(57) Abstract: The present invention relates to mutant human cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) proteins, and fusion proteins comprising said mutant CYP2B6 proteins. In particular, fusion proteins comprising mutant CYP2B6 and NAPDH-cytochrome P450 reductase are provided. The invention also relates to methods of treatment of cancer and the use of said proteins and fusion proteins in the treatment of cancer, in particular via virus-directed enzyme prodrug therapy.

MUTANT CYTOCHROME P450 2B6 PROTEINS AND USES THEREOF**FIELD OF THE INVENTION**

5 The present invention concerns mutant human cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) proteins, and fusion proteins comprising said mutant CYP2B6 proteins. The invention also relates to the use of said proteins and fusion proteins in the treatment of cancer and other diseases, in particular via enzyme prodrug therapy, as well as methods of treatment of cancer and other diseases.

10 BACKGROUND

The cytochrome P450 (CYP) family of enzymes is a diverse group of enzymes most of which catalyse the oxidation of organic substances, including metabolic intermediates and toxins such as drugs. CYPs catalyse oxidation reactions via electron transfer from NADPH by a reductase, usually NADPH-cytochrome P450 reductase.

15 CYPs are the main enzymes involved in drug metabolism and bioactivation. They have thus found use in enzyme prodrug therapy, a tumour therapy aimed at reducing the systemic side-effects of antitumour medication. Medication is administered as a noncytotoxic prodrug and converted to its active form by drug-metabolising enzymes which are targeted to the tumour cells. Generally, tumour cells are transfected with a
20 gene encoding the enzyme which is capable of bioactivating the inactive prodrug, followed by treatment of the patient with the prodrug (gene-directed enzyme prodrug therapy or GDEPT). Viral vectors are often used for transgene introduction, a strategy known as virus-directed enzyme prodrug therapy (VDEPT). This strategy can increase both the specificity and sensitivity of drug treatment, thus reducing side effects and improving
25 efficacy.

CYP2B6 metabolises a range of toxic substances, including nicotine and the anticancer drugs cyclophosphamide, ifosfamide and thiotepa. Because of this activity, CYP2B6 has been used in models of VDEPT using the chemotherapeutic agent cyclophosphamide (CPA), which requires activation by CYP2B6 in order to render it
30 cytotoxic. In patients treated with CPA in the standard way, activation by CYP2B6 occurs in the liver, and the active drug is then transported to the tumour site via the blood stream. Such non-specific administration can cause serious side effects due to cytotoxic activity on non-tumour cells, including cardiotoxicity, renal toxicity, bone marrow suppression and neurotoxicity. CYP2B6 is thus an ideal candidate for VDEPT, and has been successfully

used in *in vivo* models of VDEPT using cytotoxicity assays (Waxman et al, Drug Metab Rev 1999, 31: 503-522; Tychopoulos et al, Cancer Gene Ther 2005, 12: 497-508).

One of the disadvantages of using CYP2B6 in a VDEPT strategy is the relatively low affinity of CYP2B6 for CPA, which shows a high K_m . Modification of the CYP2B6 enzyme to increase its catalytic efficiency (V_{max}/K_m) for 4-hydroxylation of CPA has therefore been attempted, in order to improve the therapeutic effect of CYPB26 when used in VDEPT. The inventors have previously produced a double active site mutant (I114V/V477W) by mutagenesis of the active site of CYPB26 which had a four-fold increase in CPA-4-hydroxylation efficiency compared to the wild-type enzyme, mainly as a result of an increase in enzyme affinity (Nguyen et al, Mol Pharmacol 2008, 73: 1122-1133).

Another possibility for improving the efficiency of CYP2B6-mediated VDEPT is to co-transfect tumour cells with NADPH cytochrome P450 reductase (RED) in order to supply CYP2B6 with electrons, as basal cellular reductase activity may be insufficient and may thus be a limiting factor for CYP2B6 activity. Earlier work by the inventors has shown that supplying external RED in this way can increase CYP2B6-mediated toxicity. Two approaches were successfully used to supplement intratumoral RED activity and increase CYP2B6 activity: co-transfection of separate RED and CYP2B6 proteins, and creation of a CYP2B6-RED fusion protein which has both 4-hydroxylase activity and reductase activity (Tychopoulos et al, Cancer Gene Ther 2005, 12: 497-508).

These studies have shown that there is scope for improving the efficiency of CYP2B6 when used in enzyme-directed prodrug therapy. Such improvement could permit known drugs to be used on new tumour targets, as well as improving the response of known targets to drug therapy. Modulation of CYP2B6 activity is thus of great potential clinical importance and represents a useful potential tool in treating cancer.

SUMMARY OF THE INVENTION

The inventors have produced a novel mutant human CYP2B6 protein which has an affinity for CPA 8 times greater than that of the wild-type enzyme, while retaining the same V_{max} . The mutant was obtained by mutating isoleucine at position 114 to valine, leucine at position 199 to methionine and valine at position 477 to tryptophan. The inventors have demonstrated that the mutant protein retains its activity when produced as part of a fusion protein with NADPH cytochrome p450 reductase fusion protein, and that the fusion protein can confer cytotoxic activity on CPA against tumour cell lines which do not respond to CPA alone. They have also shown that the linker of the fusion protein can play a role in

enhancing the effectiveness of the fusion protein; in particular by improving reductase activity.

The CYP2B6 triple mutant protein created by the inventors was 10 times more efficient at metabolising CPA into cytotoxic metabolite than the wild-type protein, a far greater improvement than that obtained with the double mutant previously reported. The triple mutant very efficiently sensitised CPA-resistant tumour cells to CPA and resulted dramatic reductions in tumour size in animal models. The triple mutant may thus be used to render drug-resistant tumours sensitive to treatment and to reduce the amount of drug required for effective tumour treatment, reducing the risk of side effects.

Thus, the invention provides a CYP2B6 protein having the amino acid sequence of Fig 1 (SEQ ID No 1), or a variant or fragment thereof, wherein said variant or fragment comprises residues 114V, 199M and 477W as shown in Fig 1 (SEQ ID No 1). Preferably, said variant or fragment retains a biological activity of a protein having the full-length amino acid sequence of Fig 1 (SEQ ID No 1).

Also provided is a fusion protein comprising (i) a CYP2B6 protein of the invention as defined herein, and (ii) a NADPH-cytochrome P450 reductase protein as defined herein. In a preferred embodiment, said CYP2B6 protein comprises amino acids 1-490 of the amino acid sequence shown in Fig 1 (SEQ ID No 1), and/or said NADPH-cytochrome P450 reductase comprises amino acids 57-678 of Fig 2 (SEQ ID No 2). In one embodiment, the CYP2B6 protein is upstream of the NADPH-cytochrome P450 reductase. In some embodiments, the proteins are separated by a linker, preferably a polypeptide linker. In some embodiments, the linker comprises Ser_nThr, wherein n may be 1 to 7, optionally 3, optionally 5.

Also provided is an isolated nucleic acid encoding any of the proteins disclosed herein, including all disclosed variants, fragments and fusion proteins.

Also provided is a vector comprising said nucleic acid, for example an expression vector and/or a vector capable of transfecting or infecting a host cell such as a tumour cell. Suitable vectors include RNA, DNA, viral and retroviral vectors.

Further provided is a host cell comprising said vector. A host cell may be, for example, a bacterial, yeast, mammalian or plant cell. Where the cell is a mammalian cell, said cell is preferably not comprised within a human body.

Also provided is a method of making a fusion protein as disclosed herein, comprising culturing said host cell conditions suitable for expression of said protein, and optionally purifying said protein from the cell culture.

Also provided is a protein, fusion protein or vector of the invention for use in a method of treatment of the human or animal body. The treatment may be treatment of

cancer, for example cancer of the head and neck, leukaemia, lymphoma, gliosarcoma, pancreatic cancer, breast cancer and melanoma. In preferred embodiments, said protein or vector is administered in combination with a chemotherapeutic agent, either simultaneously or sequentially. Preferably, the chemotherapeutic agent is administered in
5 prodrug form.

Further provided is a method of treatment of cancer comprising administering a protein, fusion protein or vector of the invention, to a patient, preferably a patient in need thereof, in combination with a chemotherapeutic agent, either sequentially or simultaneously. Preferably, the chemotherapeutic agent is administered in prodrug form.

10

Enzyme prodrug therapy

The proteins of the invention may find use in enzyme prodrug therapy, including antibody-directed prodrug therapy (ADEPT), and gene-directed prodrug therapy (GDEPT) such as virus-directed enzyme prodrug therapy (VDEPT). The principle of these different
15 approaches is identical: an chemotherapeutic agent is administered in an inactive prodrug form, and converted within the body to active drug by an enzyme which is targetted to tumour cells. In GDEPT, tumour cells are transfected with a vector, such as a virus, which expresses the desired enzyme within the tumour cells. In ADEPT, the enzyme is delivered to tumour cells by linkage to a targeting antibody which preferentially binds to
20 tumour cells. Once the prodrug has been converted to active drug by the targeted enzyme, it can then diffuse to neighbouring cells to exert its effect.

VDEPT is carried out using a virus which can infect tumour cells. Such viruses may include retroviruses, preferably viruses which referentially infect dividing cells, as detailed below.

25 Alternatively, the enzyme of interest may be expressed under control of a transcriptional regulatory sequence whose expression is limited to a certain cell type or cancer type.

A chemotherapeutic agent is a chemical compound useful in the treatment of cancer. Examples of chemotherapeutic agents include cytostatic agents, cytotoxic agents,
30 growth inhibitory agents and toxins. Exemplary chemotherapeutic agents that may be used in tumour therapy with the proteins of the invention include cyclophosphamide (CAS number 50-18-0, also known as cyclophosphane, and the trade names Endoxan, Neosar, Procytox and Revimmune), AQ4N (1,4-bis-[[2-(dimethylamino-N-oxide)ethyl]amino]5,8-dihydroxyanthracene-9, 10-dione, also known as Banoxantrone), ifosfamide (CAS number
35 3778-73-2), bezyloxyresorufine , 7-Ethoxy-4-trifluoro-methyl-Coumarin (EFC), Bupropion, thiotepa (N,N'N'-triethylenethiophosphoramidate, CAS number 52-24-4),

mytomycin C (CAS number 50-0-07) and tirapazamine (SR-4233, CAS number 27314-97-2).

In preferred embodiments, the chemotherapeutic agent is a prodrug, or is administered in prodrug form. A prodrug is an inactive form of a drug which is converted to its active form by enzymatic action. The prodrugs for use in the present invention are preferably activated by CYP2B6 and/or NADPH-cytochrome P450 reductase.

Enzyme prodrug therapy may conceivably be applied to conditions other than cancer which are treated with drugs which require enzymatic activation. For example, CYP2B6 metabolises many other drugs in addition to chemotherapeutic drugs. CYP2B6 and the proteins and fusion proteins of the invention may thus be used in prodrug therapy of conditions treatable with such drugs. These drugs include bupropione, used to help give up smoking and nicotine addiction; clopidogrel, used to prevent and treat atherothrombosis; efavirenz and nevirapine, antiretrovirals used to treat HIV infection and AIDS.

Protein and nucleic acid sequences

The invention provides proteins having the sequences disclosed in any of SEQ ID Nos 1 to 4, variants and fragments thereof, and nucleic acids encoding said sequences. Reference herein to 'proteins' or 'the proteins of the invention' may be understood to encompass said variants and fragments in addition to the sequences disclosed in Figs 1-4.

The invention relates in part to provides mutant forms of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6). The amino acid sequence of the wild-type human CYP2B6 is shown in Fig 5 (SEQ ID No 5). The inventors have produced a novel mutant human CYP2B6 protein which has an affinity for CPA 8 times greater than that of the wild-type enzyme, while retaining the same V_{max} , by introducing the substitutions I114V, L199M and V477W as shown in Fig 1 (SEQ ID No 1). The mutant sequence is shown in Fig 1 (SEQ ID No 1).

As described below, variants and fragments of the amino acid sequence shown Fig 1 (SEQ ID No 1) are encompassed within the scope of the invention. However, all of the CYP2B6 proteins, variants and fragments of the invention as disclosed herein retain Val at the position corresponding to residue 114 of the amino acid sequence shown Fig 1 (SEQ ID No 1), Met at the position corresponding to residue 199 of the amino acid sequence shown Fig 1 (SEQ ID No 1), and Trp at the position corresponding to residue 477 of the amino acid sequence shown Fig 1 (SEQ ID No 1).

The amino acid sequence of wild-type NADPH-cytochrome P450 reductase is shown in Figure 2 (SEQ ID No 2). NADPH-cytochrome P450 reductase proteins which

are variants and fragments of the amino acid sequence of Figure 2 (SEQ ID No 2), as described below, are also encompassed within the scope of the invention.

Variant proteins may be naturally occurring variants, such as splice variants, alleles and isoforms, or they may be produced by recombinant means. Variations in amino acid sequence may be introduced by substitution, deletion or insertion of one or more codons into the nucleic acid sequence encoding the protein that results in a change in the amino acid sequence of the protein. Optionally the variation is by substitution of 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 or more amino acids with any other amino acid in the protein. Additionally or alternatively, the variation may be by addition or deletion of 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 or more amino acids within the protein.

Amino acid substitutions may be conservative or non-conservative. Preferably, substitutions are conservative substitutions, in which one amino acid is substituted for another amino acid with similar structural and/or chemical properties. Exemplary conservative substitutions are listed below.

Ala (A) val; leu; ile
Arg (R) lys; gin; asn
Asn (N) gln; his; lys
Asp (D) glu
Cys (C) ser
Gln (Q) asn
Glu (E) asp
Gly (G) pro; ala
His (H) asn; Gln; lys; arg
He (I) leu; val; met; ala
norleucine leu
Leu (L) norleucine; ile; met; ala; phe
Lys (K) arg; Gln; asn
Met (M) leu; phe; ile
Phe (F) leu; val; ile; ala; tyr
Pro (P) ala
Ser (S) thr
Thr (T) ser
Trp (W) tyr; phe
Tyr (Y) trp; phe; thr; ser
Val (V) ile; leu; met; phe; ala; norleucine

Variant proteins may include proteins that have at least about 80% amino acid sequence identity with a polypeptide sequence disclosed herein. Preferably, a variant protein will have at least about 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% amino acid sequence identity to
5 a full-length polypeptide sequence or a fragment of a polypeptide sequence as disclosed herein. Amino acid sequence identity is defined as the percentage of amino acid residues in the variant sequence that are identical with the amino acid residues in the reference sequence, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity, and not considering any conservative substitutions
10 as part of the sequence identity. Sequence identity may be determined over the full length of the variant sequence, the full length of the reference sequence, or both. Methods for sequence alignment and determination of sequence identity are well known in the art, for example using publicly available computer software such as BioPerl, BLAST, BLAST-2, CS-BLAST, FASTA, ALIGN, ALIGN-2, LALIGN, Jaligner, matcher or Megalign
15 (DNASTAR) software and alignment algorithms such as the Needleman-Wunsch and Smith-Waterman algorithms.

Fragments of the proteins and variant proteins disclosed herein are also encompassed by the invention. Such fragments may be truncated at the N-terminus or C-terminus, or may lack internal residues, for example, when compared with a full length
20 protein. Certain fragments lack amino acid residues that are not essential for enzymatic activity. Preferably, said fragments are at least about 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 150, 250, 300, 350, 400, 450, 500 or more amino acids in length.

Preferred fragments of the proteins disclosed herein comprise all or a part of the active site. Preferred fragments of CYP2B6 comprise or consist of amino acids 1-490 of
25 the full length sequence shown in Fig 1 (SEQ ID No 1). Preferred fragments of NADPH-cytochrome P450 reductase comprise or consist of fragments comprising or consisting of amino acids 27-678 of the amino acids sequence shown in Fig 2 (SEQ ID No 2).

The variants and fragments of the invention preferably retain a biological activity of the full-length protein disclosed herein. Variants and fragments of full-length CYP2B6
30 preferably have the activity of oxidising a substrate such as cyclophosphamide, or other substrate as disclosed herein, in particular by catalysing hydroxylation of 4-OH-CPA. In a preferred embodiment, said variants and fragments have an affinity for CPA greater than that of the wild-type CYP2B6 sequence shown in Fig 5, preferably at least 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 or 10 times that of the wild-type sequence. In a particularly preferred embodiment,
35 said variants and fragments have an affinity for CPA the same as, substantially the same as, or greater than, that of the full-length mutant CYP2B6 sequence shown in Fig 1 (SEQ

ID No 1). Methods for assaying said activity and affinity are described below and in Nguyen et al, Mol Pharmacol 2008, 73: 1122-1133. Variants and fragments of NADPH-cytochrome P450 reductase preferably have the activity of reduction of cytochrome c, preferably in a NADPH-dependent fashion. In a preferred embodiment, said variants and fragments have an activity the same as, substantially the same as, or greater than, that of the full-length mutant NADPH-cytochrome P450 reductase sequence shown in Fig 2 (SEQ ID No 2). Methods for assaying said activity are described below and in Yasukochi et al; Arch Biochem Biophys 1980, 202: 491-498.

The skilled person will be able to determine amino acid residues which may be inserted, substituted or deleted without adversely affecting the activity of the protein using knowledge of the protein structure available in the art and publicly available molecular modelling techniques (see for example Nguyen et al, Mol Pharmacol 2008, 73: 1122-1133). The variation allowed may be determined by systematically making insertions, deletions or substitutions of amino acids in the sequence and testing the resulting variants for activity exhibited by the parent protein.

Vectors

Nucleic acids encoding the proteins of the invention may be incorporated into vectors, for example replicable vectors for cloning and amplification, vectors for transfection or infection of cells, or vectors for *in vitro* production of the proteins. All such vectors are included within the scope of the invention.

The vector may, for example, be in the form of a plasmid, cosmid, viral particle, or phage. The appropriate nucleic acid sequence may be inserted into the vector by a variety of procedures. In general, DNA is inserted into an appropriate restriction endonuclease site(s) using techniques known in the art. Vector components generally include, but are not limited to, one or more of a signal sequence, an origin of replication, one or more marker genes, an enhancer element, a promoter, and a transcription termination sequence. Many vectors are publicly available and construction of suitable vectors employs standard ligation techniques which are known to the person skilled in the art.

Where the vector is intended to introduction of the protein into the cells of a patient, viral vectors are preferred, although the vector may be any DNA or RNA vector used or suitable to VDEPT or GDEPT therapies. Viral vectors may include DNA viruses such as adenovirus and retroviruses, preferably retroviruses which preferentially infect dividing cells such as tumour cells. Exemplary retroviruses include lentivirus, alpharetrovirus, betaretrovirus, gammaretrovirus, deltaretrovirus and epsilonretrovirus. Retroviral shuttle vectors are also encompassed within the scope of the invention.

Retroviral shuttle vectors are generated using the DNA form of the retrovirus contained in a plasmid with the certain parental endogenous retroviral genes (e.g. gag pol and env) removed and the DNA sequence of interest inserted. Retroviral shuttle vectors may be derived from retroviruses or from certain DNA viruses, such as the BPV virus or adenoviruses.

The vector may be an expression vector suitable for expression of the protein, for example in a cell in culture, or within a tumour cell in a patient. The nucleic acid encoding the protein of the invention will preferably be operably linked to a promoter permitting expression of the protein. 'Operably linked' means joined as part of the same nucleic acid molecule, suitably positioned and oriented for transcription to be initiated from the promoter. Thus there may be elements such as 5' non-coding sequence between the promoter and coding sequence which is not native to either the promoter nor the coding sequence. Such sequences can be included in the vector if they do not impair the correct control of the coding sequence by the promoter.

Suitable promoters include viral promoters such as mammalian retrovirus or DNA virus promoters, for example MLV, CMV, RSV and adenovirus promoters. Preferred adenovirus promoters are early gene promoters. Strong mammalian promoters may also be suitable. Variants of such promoters retaining substantially similar transcriptional activities may also be used.

Fusion proteins

Fusion proteins are chimeric proteins created by joining two or more genes encoding separate proteins or protein fragments, such as different protein domains, into a single reading frame encoding a single translated protein. The fusion proteins of the present invention preferably comprise a CYP2B6 protein as disclosed herein, and a NADPH-cytochrome P450 reductase protein as disclosed herein. In a preferred embodiment, said fusion protein comprises residues 1-490 of CYP2B6 and residues 57-678 of NADPH-cytochrome P450 reductase, though any of the full-length proteins, variants and fragments disclosed herein may be used. The CYP2B6 protein may be upstream or downstream of the NADPH-cytochrome P450 reductase. Preferably, the CYP2B6 protein is upstream of the NADPH-cytochrome P450 reductase.

When context permits, reference herein to 'the proteins of the invention', 'the proteins disclosed herein' etc should be understood to encompass said fusion proteins.

The proteins or protein fragments making up the fusion protein may be separated by a linker peptide sequence or spacer. The linker serves to separate the component proteins or protein fragments and aid effective folding and activity of the individual

components. The linker may comprise an enzyme cleavage site to permit the component polypeptides to be separated by enzymatic digestion. The linker may be, for example, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 amino acids or more in length. Preferably, the linker is less than 10, less than 8, less than 7, less than 6 or less than 5 amino acids in length. Exemplary linkers for use in the fusion proteins of the present invention comprise Ser_nThr, where 'n' is any whole integer, preferably 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, or 9. In a preferred embodiment, 'n' is 5. In another preferred embodiment, 'n' is 3.

Methods of treatment

'Treatment' includes both therapeutic treatment and prophylactic or preventative treatment, wherein the object is to prevent or slow down the targeted pathologic condition or disorder. Those in need of treatment include those already with the disorder as well as those prone to have the disorder or those in whom the disorder is to be prevented. The terms 'therapy', 'therapeutic', 'treatment' or 'treating' include reducing, alleviating or inhibiting or eliminating the symptoms or progress of a disease, as well as treatment intended to reduce, alleviate, inhibit or eliminate said symptoms or progress. Desirable effects of treatment include preventing occurrence or recurrence of disease, alleviation of symptoms, diminishment of any direct or indirect pathological consequences of the disease, preventing metastasis, decreasing the rate of disease progression, amelioration or palliation of the disease state, and remission or improved prognosis. In some embodiments, methods and compositions of the invention are used to delay development of a disease or disorder or to slow the progression of a disease or disorder.

Treatment in accordance with the invention includes a method of treating a cancer or other neoplastic disorder which comprises administering to a patient in need of treatment a protein, vector or pharmaceutical composition of the invention. Preferably, the treatment further comprises administering to said patient a chemotherapeutic drug, preferably a drug in prodrug form. The two components may be administered together, for example in the form of a combined pill, or separately. Administration may be sequential or simultaneous. 'Sequential' administration indicates that the components are administered at different times or time points, which may nonetheless be overlapping. Simultaneous administration indicates that the components are administered at the same time.

Preferably, an effective amount, preferably a therapeutically effective amount of the protein or vector of the invention is administered. An 'effective amount' refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired

therapeutic or prophylactic result. The effective amount may vary according to the drug or prodrug with which the protein or vector is co-administered.

A 'therapeutically effective amount' of a protein or vector of the invention may vary according to factors such as the disease state, age, sex, and weight of the individual, and the ability of the protein, to elicit a desired therapeutic result. A therapeutically effective amount encompasses an amount in which any toxic or detrimental effects of the protein are outweighed by the therapeutically beneficial effects. A therapeutically effective amount also encompasses an amount sufficient to confer benefit, e.g., clinical benefit.

In the case of pre-cancerous, benign, early or late-stage tumors, the therapeutically effective amount of the composition of the invention may reduce the number of cancer cells; reduce the primary tumor size; inhibit (i.e., slow to some extent and preferably stop) cancer cell infiltration into peripheral organs; inhibit (i.e., slow to some extent and preferably stop) tumor metastasis; inhibit or delay, to some extent, tumor growth or tumor progression; and/or relieve to some extent one or more of the symptoms associated with the disorder. To the extent the drug may prevent growth and/or kill existing cancer cells, it may be cytostatic and/or cytotoxic. For cancer therapy, efficacy in vivo can, for example, be measured by assessing the duration of survival, time to disease progression (TTP), the response rates (RR), duration of response, and/or quality of life.

'Neoplastic disease', 'cancer' and 'tumour' refer to or describe the physiological condition in mammals that is typically characterized by unregulated cell growth. Examples of cancer include carcinoma, lymphoma, blastoma, sarcoma, and leukemia or lymphoid malignancies. More particular examples of such cancers include squamous cell cancer, lung cancer including small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, adenocarcinoma of the lung and squamous carcinoma of the lung, cancer of the peritoneum, hepatocellular cancer, gastric or stomach cancer including gastrointestinal cancer and gastrointestinal stromal cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, gliosarcoma, cervical cancer, ovarian cancer, liver cancer, bladder cancer, cancer of the urinary tract, hepatoma, breast cancer, colon cancer, rectal cancer, colorectal cancer, endometrial or uterine carcinoma, salivary gland carcinoma, kidney or renal cancer, prostate cancer, vulval cancer, thyroid cancer, hepatic carcinoma, anal carcinoma, penile carcinoma, melanoma, multiple myeloma and B-cell lymphoma; chronic lymphocytic leukaemia (CLL); acute lymphoblastic leukaemia (ALL); hairy cell leukaemia; chronic myeloblastic leukaemia; head and neck cancer; and associated metastases. In certain embodiments, cancers that are amenable to treatment by the antibodies of the invention include cancers of the head and neck, leukaemia, lymphoma, gliosarcoma, pancreatic cancer, breast cancer and melanoma.

Pharmaceutical compositions and administration

The proteins and vectors of the invention may be formulated in a pharmaceutical composition in combination with a carrier. Carriers include pharmaceutically acceptable carriers, excipients, or stabilizers which are nontoxic to the cell or mammal being exposed thereto at the dosages and concentrations employed. Often the physiologically acceptable carrier is an aqueous pH buffered solution. Examples of physiologically acceptable carriers include buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid; low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptide; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, arginine or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugar alcohols such as mannitol or sorbitol; salt-forming counterions such as sodium; and/or nonionic surfactants such as TWEEN™, polyethylene glycol (PEG).

The formulation or pharmaceutical compositions of the invention may also contain more than one active compound. For example, it may comprise a chemotherapeutic agent or prodrug in addition to the protein or vector of the invention. Other molecules or compounds with complementary activities, such as immunosuppressive agents, may also be included.

The proteins, vectors and compositions of the invention may be administered via any route of administration is in accord with known methods, e.g. injection or infusion by intravenous, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial or intralesional routes, topical administration, or by sustained release systems.

Dosages and desired drug concentrations of pharmaceutical compositions of the present invention may vary depending on the particular use envisioned. The determination of the appropriate dosage or route of administration is well within the skill of an ordinary physician. Animal experiments provide reliable guidance for the determination of effective doses for human therapy.

The invention will now be described in more detail with reference to the following figures and examples.

All documents cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety.

FIGURES

Fig 1 shows the amino acid sequence of a mutant CYP2B6 comprising 114V, 199M and 477W.

Fig 2 shows the amino acid sequence of wild-type human NADPH-cytochrome P450 reductase.

Fig 3 shows the sequence of the mutant CYP2B6-NADPH-cytochrome P450 reductase fusion protein.

5 **Fig 4** shows the sequence of wild-type human CYP2B6 protein.

Fig 5 shows the cloning strategy for construction of the CYP2B6TM-RED fusion proteins, including the insertion of different linker sequences.

Fig 6 shows plasmid pENG1 delta cppT (pENG1 cppT.EF1 long eGFP deleted of eGFP by excision of the fragment between Eco47III and BsrG1 restriction sites).

10 **Fig 7** shows plasmid pCMV8.91 coding for gag and pol proteins.

Fig 8 shows plasmid p.MD2G coding for envelope proteins.

Fig 9 shows V_{\max} and K_m of CPA-4' hydroxylation in yeast microsomes expressing CYP2B6wt (filled inverted triangles) and CYP2B6TM (triple mutant, filled squares). The V_{\max} of the wild-type protein was $107.3 \pm 3.74 \text{ min}^{-1}$ and the K_m was $4.33 \pm 0.5 \text{ mM}$. The V_{\max} of the triple mutant was $107.5 \pm 3.4 \text{ min}^{-1}$ and the K_m was $0.51 \pm 0.08 \text{ mM}$. CYP2B6TM showed a 8.5 increase in CPA-4OH catalytic efficiency (V_{\max} / K_m), mainly as a result of an increase in enzyme affinity.

Fig 10 shows IC_{50} values of infected A549 pulmonary cell lines after CPA treatment. A549 cells were infected with Ad-CYP2B6wt (200MOI), Ad-CYP2B6wt-RED (linker 2S + 1T) (200 MOI) and treated with CPA for five days from the day following infection, or infected by LV-CYP2B6TM-RED (linker 5S+1T) (100MOI) and treated for five days. Cells expressing CYP2B6TM-RED were more sensitive to CPA than cells expressing CYP2B6wt or CYP2B6wt-RED.

25 **Fig 11** shows the cytotoxicity of cyclophosphamide on human tumour cell lines A549 (pulmonary cancer cell line) and A253 (submandibular gland carcinoma) expressing GFP (control; filled diamonds) or CYP2B6TM-RED (linker 5S + 1T; filled squares) after 2 days of treatment.

Fig 12 shows the cytotoxicity of cyclophosphamide on TC1-Luc2 cells expressing GFP (control; filled diamonds) or CYP2B6TM-RED (linker 5S + 1T; filled squares) in 96-well plates after 2 days of treatment.

30 **Fig 13** shows the cytotoxicity of cyclophosphamide on TC1-Luc2 cells expressing GFP (control; filled diamonds) or CYP2B6TM-RED (linker 5S + 1T; filled squares) in 96-well plates after 3 days of treatment.

Fig 14 shows change in tumour volume after treatment with CPA in lung tumour explants in a mouse model. C57 Bl/6 mice were subcutaneously injected with TC1 cells expressing CYP2B6TM-RED or with uninfected cells. CPA was administered at

140mg/kg by i.p. injection (arrows). In control mice untreated with CPA, tumour volume increased rapidly in both uninfected cells (inverted triangles) and in CYP2B6TM-RED-expressing cells (diamonds). CPA treatment slowed this rapid increase in uninfected tumour cells but obtained no reduction in overall tumour size (squares). In contrast, CPA
5 treatment produced a rapid regression of tumours expressing CYP2B6TM-RED (triangles).

EXAMPLES

10 *Construction of the CYP2B6 triple mutant (CYP2B6TM):*

Site-directed mutagenesis was based on the QuikChange kit (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) using mutagenic primers and V-60CYP2B6 wt (described in Gervot L, Rochat B, Gautier JC, Bohnenstengel F, Kroemer H, de Berardinis V, et al (1999): Human CYP2B6: expression, inducibility and catalytic activities.
15 Pharmacogenetics 9:295-306) as template followed by DpnI digestion and transformation into competent DH5 α bacteria. Three mutations were made: I114V, L199M and V477W. The CYP2B6 triple mutant was sequenced to be sure that the desired mutation was obtained.

20 *Construction and expression of the CYP2B6 triple mutant-reductase (CYP2B6TM-RED) fusion genes with different linkers.*

To have a complete system that can operate efficiently in the tumoral cells, the inventors chose to express NADPH-P450 reductase (RED) as part of a fusion protein with CYP2B6 instead of two separate proteins. The fusion gene was constructed with two
25 sequences of human origin : human CYP2B6, at the N-terminus, bound to the soluble portion of human NADPH-CYP reductase, at the C-terminus. The amino-terminal hydrophobic region of the RED (first 56 amino acids) was deleted and the fusion protein was anchored to the membrane by the CYP2B6 N-terminal. The amino-terminal hydrophobic region of CYP2B6 was important for correct localisation of the newly
30 synthesized polypeptide into the microsomal membranes as well as for its sufficient enzymatic activity. The remaining hydrophilic C-terminal of RED (from Ile-57 to stop codon-678) contains the FMN-binding domain, the connecting domain and the FAD-NADPH-binding domains (Wang et al, PNAS 94:8411-8416, 1997) allowing efficient electron transfer.

The inventors had previously reported the successful construction and expression in mammalian cells of an active human CYP2B6-human NADPH P450 reductase in mammalian cells using a Ser-Ser-Thr linker. (Tychoopoulos et al, Cancer Gene Ther 2005, 12: 497-508). However, although our fusion protein was functional and therefore that electrons were successfully transferred from the flavin moiety to the heme in the CYP2B6 fragment of the protein, this electron transfer was nevertheless not optimal. The structure of the hinge region between CYP2B6 and RED domains had to be optimized.

From an investigation of linker peptides joining domains in 51 natural protein tertiary structures, Argos (J. Mol. Biol, 211: 943-958,1990) showed that Thr, Ser, Gly are desirable linker constituents. The preferred linker amino acids are mostly small and not hydrophobic, the basic and acidic groups are excluded, as well as large and bulky hydrophobic residues and the average length of the linker is 6,5 residues. Moreover, a peptide linker used to connect two polypeptide domains and comprising a large proportion of serine residues produces a fusion protein with an improved resistance to proteolysis.

The inventors compared the effect of several linkers on the efficiency of the CYP2B6-human NADPH P450 reductase fusion protein to metabolize CYP2B6 substrates, such as cyclophosphamide or benzyloxyresorufin. The linkers tested were: Ser-Thr, Ser-Ser, Ser-Ser-Thr and (Ser)₃₋₇-Thr.

CYP2B6TM (the whole coding sequence without the stop codon TGA) and the soluble part of human RED (from bp 171 until the stop codon TAG) with different linker sequences (1ser+1thr, 2ser or 2 to 7ser + thr) between the two proteins (Figure 6) was subcloned into pYEDP60 plasmid and expressed in W(R) *S. Cerevisiae* yeast strain to test its efficiency to metabolize cyclophosphamide or into pENG1 delta cppT (pENG1 cppT.EF1 long eGFP deleted of eGFP by excision of the fragment between Eco47III and BsrG1 restriction sites, Figure 7) for lentivirus production. The constructs were sequenced using an automatic Perkin Elmer sequencer to ensure that the correct reading frame was retained whatever the linker sequence used.

Expression in Yeasts.

The yeast expression plasmid pYeDP60 and the W(R) *S. cerevisiae* strain were constructed by substitution of the natural W303-1B yeast reductase promoter by the galactose inducible GAL10-CYC1 hybrid promoter (described in Truan G, Cullin C, Reisdorf P, Urban P, Pompon D. (1993): Enhanced in vivo monooxygenase activities of mammalian P450s in engineered yeast cells producing high levels of NADPH-P450 reductase and human cytochrome b5. Gene 125:49-55).

CYP2B6wt or CYP2B6TM alone or in fusion with RED were expressed in the W(R)

yeast strain, in which yeast NADPH cytochrome P450 reductase was constitutively expressed. The pYeDP60 plasmids were introduced into intact yeast cells based on a refined lithium acetate-mediated protocol as described in Truan et al, 1993, above . Yeast culture conditions were as described in Bellamine A, Gautier JC, Urban P, Pompon D
5 (1994): Chimeras of the human cytochrome P450 1A family produced in yeast. Accumulation in microsomal membranes, enzyme kinetics and stability. Eur J Biochem 225:1005-13.

Cell lines

10 Human pulmonary cell line (A549) was cultured in RPMI containing 10% fetal bovine serum (FBS) and supplemented with penicillin (200U/ml), streptomycin (50µg/ml) and fungizone (0.5 µg/ml).

Human A-253 head and neck epidermoid carcinoma cell line was grown as a monolayer in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum,
15 nonessential aminoacids for Dulbecco's modified Eagle's medium, penicillin at 200U/ml, streptomycin at 50 µg/ml and fungizone (0.5 µg/ml).

Adenoviral infections

CYP2B6wt or CYP2B6wt-RED were cloned into serotype 5 adenovirus. The
20 recombinant adenoviral vectors were generated by homologous recombination between a shuttle vector (pTrack-CMV) and the adenoviral backbone vector (pAdEASY-1) (see He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. (1998): A simplified system for generating recombinant adenoviruses. Proc Natl Acad Sci U S A 95:2509-14). The deletion of the adenoviral E1 renders the virus unable to produce infectious viral particles
25 in target cells, and deletion of the E3 region is dispensable for viral production since it encodes proteins involved in evading host immunity. An adenoviral vector expressing LacZ was used as control (Ad-LacZ).

The standard infection procedure consisted in diluting the desired adenoviral quantity into cell culture medium (with 2% FBS) to infect cells with 200 multiplicity of
30 infection (MOI) (i.e., number of infectious particles/cell). Cells were incubated for 4 hours with the adenoviral constructs and then reconstituted in cell culture medium.

Lentiviral infections

Lentiviral production was performed in HEK293T cells transfected with 3 plasmids : pENG1 delta cppT- CYP2B6TM-RED, pCMV8.91 coding for gag and pol proteins (Figure

7) and p.MD2G coding for envelope proteins (Figure 8). Quantification of viral particles was estimated by p24 measurement (HIV-1 p24 antigen ELISA, Zeptomatrix corporation). A lentiviral vector expressing green fluorescent protein (GFP) was used as control (LV-GFP).

5 The standard infection procedure consisted in diluting the desired lentiviral quantity into cell culture medium to infect cells with 100 MOI. To increase lentivirus infection protamine sulfate (8µg/ml) was added to the medium. Cells were incubated 3 hours in a minimal volume before adding cell culture medium to recommended volume. 24 hours later, the cell culture medium was renewed.

10

Transgene expression

Transgene expression was checked by Western blot using a polyclonal anti-CYP2B6 antibody and/or a polyclonal anti-human RED antibody (Lifespan Biosciences). After adenoviral infection, overexpression of the transgenes was maximal at 3 days after infection, as previously described (Narjoz C, Marisa L, Imbeaud S, Paris A, Delacroix H, Beaune P, et al. Genomic consequences of cytochrome P450 2C9 overexpression in human hepatoma cells. Chem Res Toxicol 2009;22:779-87). After lentiviral infection, overexpression of the transgenes remained stable from 8 days after infection until several weeks since the transgene was integrated in the cell genome. These results were confirmed by immunofluorescence.

20

Microsomal preparation

Yeast microsomes were prepared based on the mechanical disruption method using glass beads as described in Bellamine A, Gautier JC, Urban P, Pompon D. (1994): Chimeras of the human cytochrome P450 1A family produced in yeast. Accumulation in microsomal membranes, enzyme kinetics and stability. Eur J Biochem 225:1005-13.

25

Three days after adenoviral infections or at least 8 days after lentiviral infection, infected cells were trypsinized and washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), and the cellular pellet was resuspended in STE buffer (0.25 mM Sucrose, 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7.4) containing antiproteases (Roche diagnostics GmbH, Germany) and sonicated three times 10 seconds. The sonicated lysate was centrifuged at 9000 g for 20 minutes, and subsequently the supernatant was centrifuged at 100,000 g for 1 hour. The 100,000 g pellet containing the microsomes was resuspended in buffer (100 mM NaPO₄, 10 mM MgCl₂, 20% Glycerol (w/v) at pH 7.4), aliquoted and frozen at -80 °C.

30

Microsomal protein concentration was determined by the bicinchoninic acid (BCA) procedure according to the manufacturer's instructions (Pierce, Rockford, IL) using bovine

35

serum albumin as a standard

CPA 4-Hydroxylase Activity.

The fluorometric determination of yeast microsomal CPA 4-hydroxylase was adapted from a technique described previously (Roy P, Yu LJ, Crespi CL, Waxman DJ. (1999): Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P-450 profiles. Drug Metab Dispos 27:655-66) for a 96-well microplate with several modifications. Incubations were carried out for 1 h at 28°C in a total volume of 200 µl and included 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 1 mM EDTA, 10 pmol of CYP2B6wt or CYP2B6TM or CYP2B6TM-RED with different linkers (microsomal P450 content was spectrally determined by the method of Schoene B, Fleischmann RA, Remmer H, von Oldershausen HF. (1972): Determination of drug metabolizing enzymes in needle biopsies of human liver. Eur J Clin Pharmacol 4:65-73) and 10 mM CPA. Reactions were initiated by adding the NADPH-generating system and stopped by the addition of 200 µl of 10% trichloroacetic acid. After centrifugation at 13,000g and 4°C for 15 min to pellet the proteins, 300 µl of the supernatant was transferred to a clean test tube containing 160 µl of the fluorescence mixture (6 mg of 3-aminophenol and 6 mg of hydroxylamine hydrochloride freshly dissolved in 1 ml of 1N HCl). Samples were heated at 90°C for 20 min to form 7-hydroxyquinoline by condensation of the 4-hydroxy-CPA with 3-aminophenol. After cooling to room temperature, fluorescence reading were performed on a Bio-tek FL600 microplate fluorescence reader (excitation at 350 nm and emission at 515 nm). Under these assay conditions, product formation was linear with time, and the enzyme concentration and amount of 4-hydroxy-CPA under these assay conditions was determined based on a standard curve of 4-hydroxy-CPA (0-20 µM) incubated with bovine serum albumin and treated in parallel under the same assay conditions.

The kinetic constants of cyclophosphamide hydroxylase were determined by a nonlinear regression with 15 substrate concentrations (0.05 to 25 mM). Data were analyzed using Prism software (Graph-Pad Software, Inc., San Diego, CA) to calculate kinetic parameters (K_m , V_{max}), with V_{max} values expressed as moles of product formed per minute, normalized to the moles of P450 included in each reaction (turnover number expressed as minutes^{-1}). Data shown were based on duplicate determinations for each data point.

V_{max} and K_m of CPA-4' hydroxylation were determined in yeast microsomes expressing CYP2B6wt and CYP2B6TM (Figure 9). CYP2B6TM showed a 8.5 increase in

CPA-4OH catalytic efficiency (V_{\max} / K_m), mainly as a result of an increase in enzyme affinity.

RED activity assay

5 RED activity was measured in the cellular microsomal fraction. The NADPH-dependent reduction of cytochrome *c* by RED was assayed as described in Yasukochi Y, Okita RT, Masters BS. (1980): Comparison of the properties of detergent-solubilized NADPH-cytochrome P-450 reductases from pig liver and kidney. *Immunochemical, kinetic, and reconstitutive properties.* *Arch Biochem Biophys* 202:491-8. Cytochrome *c*
10 was added at a final saturating concentration of 80 M and RED activity was calculated as nmol cytochrome *c* reduced/mn/mg using $\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 550 nm

V_{\max} , K_m and V_{\max}/K_m were determined in yeast microsomes expressing CYP2B6wt, CYP2B6TM and CYP2B6TM-RED with different linkers (Table 1). For all fusion proteins, CPA-4OH catalytic efficiency was in the same range of magnitude, with
15 weak variations according to the size of the linker used, and comparable to that observed with CYP2B6TM alone, showing that addition of RED did not affect CYP2B6TM catalytic efficiency. On the other hand, after deduction of endogenous yeast reductase activity, reductase activity due to fusion protein expression differed according to linker size from 721 to 6528 nmol/min/mg. From these results, three CYP2B6TM-RED constructions with
20 different reductase activities (indicated with asteriks) were used to produce recombinant lentivirus.

Table 1

Effect of the linker on CPA hydroxylase activity and NADPH reductase activity of the CYP2B6- RED fusion protein

Linker (where present)	CPA hydroxylase activity			Reductase activity
	V_{\max}	K_m	V_{\max}/K_m	
CYP2B6wt (w/o reductase)	62.5	4.9	12.7	[n/a]
CYP2B6wt (w/o reductase)	105.5	1.05	100.5	[n/a]
1Ser + 1Thr	98.82	1.31	75.4	342,0
2Ser	87.95	1.1	80.0	72,1
2Ser + 1Thr	92.28	1.14	81	344,9
3Ser + 1Thr	114.5	1.1	104.1	652,8

4Ser + 1Thr	85.22	1.11	76.8	98,6
5Ser + 1Thr	108.5	0.89	141.9	291,7
6Ser + 1Thr	94.36	0.97	97.27	313,9
7Ser + 1Thr	95.11	1.04	91.45	119,8

CPA hydroxylase activity V_{max} is expressed as nmol 4OH-CPA/min/nmol CYP2B6 and K_m as μm . Reductase activity is expressed as nmol/min/mg, adjusted to take account of intrinsic yeast reductase activity.

5

In-vitro cytotoxicity assays

Cells were infected in six-well plates at 4×10^5 cells/well, with adenoviral constructs or lentiviral constructs as previously described. Cells were then trypsinized and seeded into 96-well plates at 10^4 cells/well in triplicates. Cells infected with an adenoviral vector expressing LacZ or with a lentiviral vector expressing green fluorescent protein (GFP) were used as controls. Cells were treated with CPA 0–3 mM for 5 days, cell viability was assayed using the "Celltiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay" (Promega) according to the manufacturer's instructions. This colorimetric assay measures the dehydrogenase activity in the metabolically active mitochondria of viable cells. After the 5-day CPA treatment, 10 μl of One Solution Reagent (Promega) were added to 100 μl of cell culture medium and cells were incubated for 2 hours at 37 °C, and subsequently the plates were read at 490 nm using a 96-well plate reader. Cell viability was expressed as the percentage of viable cells compared to those infected by controls (Ad-LacZ or LV-GFP) treated at identical CPA concentrations.

20 IC_{50} values of infected A549 pulmonary cell lines after CPA treatment are shown in Figure 10. Cells expressing CYP2B6TM-RED were more sensitive to CPA than cells expressing CYP2B6wt or CYP2B6wt-RED.

Cyclophosphamide cytotoxicity was compared in A549 and A253 cell lines, expressing GFP (control) or CYP2B6TM-RED (linker 5S+1T) as shown in Figure 11. Expression of the fusion gene rendered these previously CPA-insensitive cell lines sensitive to weak doses of CPA.

Cyclophosphamide cytotoxicity was also compared in TC1-LUC2 A549 and A253 cell lines, expressing GFP (control) or CYP2B6TM-RED (linker 3S+1T) as shown in Figures 12 and 13. Expression of the fusion protein also rendered these cell lines sensitive to weak doses of CPA. In 6-well plates, all of the CYP2B6TM-RED-infected cells were dead after treatment with 1.5 or 3mM CPA. Cells infected with GFP were unaffected. Similar results were seen in 96-well plates, as shown in Figs 12 and 13.

30

Infection de cellules TC1-Luc2 par lentivirus recombinants et traitement cyclophosphamide (CPA).

In vivo cytotoxicity assays

5 To test the capacity of the triple mutant to enhance the response to CPA *in vivo*, a mouse model was used. Mouse pulmonary tumour cells (TC1-Luc2) were infected with a lentivirus vector carrying the CYP2B6TM-RED construct and injected subcutaneously into C57Bl6 mice. As a control, uninfected TC1 cells were injected. TC1-Luc2 cells express luciferase, permitting tumour size to be monitored via bioluminescence.

10 In initial experiments, 10 mice were injected with CYP2B6TM-RED-TC1 cells and 10 were injected with uninfected TC1 cells. Tumour growth was monitored, and when the tumour size reached approximately 400mm³ half of the mice were treated with CPA via intraperitoneal injection at 140mg/kg. untreated mice were sacrificed when tumour volume reached around 1500 mm³.

15 Fig 14 shows that the effect of CPA on tumour cells expressing CYP2B6TM-RED was dramatic. CPA had only a modest effect on the uninfected tumour cells and did not produce an overall reduction in tumour volume. Tumour volume continued to increase after initial CPA treatment, followed by a slight reduction, but no overall reduction in tumour size was seen even after 4 weeks of treatment. Moreover; after the fourth and last
20 CPA injection, tumor volume again began to increase dramatically.

In contrast, CPA treatment of CYP2B6TM-RED-infected tumour cells resulted in a dramatic decrease in tumour volume. A rapid regression was seen within 48 hours of treatment, and by 3 weeks of treatment the tumours had almost vanished. Three weeks after the last CPA injection, tumours remain undetectable.

25

The inventors have shown that the triple mutant CYP2B6 protein not only has a greatly improved catalytic activity compared to wild-type, but also has a greater effect on CPA-induced cytotoxicity than does the wild-type protein. Moreover, the triple mutant protein continues to show these improved effects in the context of a fusion protein with
30 NADPH cytochrome p450 reductase. Both the triple mutant protein alone and the triple mutant- NADPH cytochrome p450 reductase fusion proteins are thus of great potential use in prodrug enzyme therapy.

CLAIMS

1. A CYP2B6 protein comprising
 - (i) the amino acid sequence of Fig 1 (SEQ ID No 1), or
 - (ii) a variant or fragment of (i), wherein said variant or fragment comprises residues 114V, 199M and 477W as shown in Fig 1 (SEQ ID No 1).
2. A CYP2B6 protein, variant or fragment according to claim 1, which
 - (iii) comprises one or more conservative amino acid substitutions; and/or
 - (iv) comprises amino acids 1-490 of Fig 1 (SEQ ID No 1); and/or
 - (v) has at least 90% amino acid identity to 1-490 of Fig 1 (SEQ ID No 1) over its full length.
3. A fusion protein comprising (i) a mutant human CYP2B6 protein according to claim 1 or claim 2, and (ii) a NADPH-cytochrome P450 reductase protein as shown in Fig 2/SEQ ID No 2 or variant or fragment thereof.
4. A fusion protein according to claim 3, wherein said NADPH-cytochrome P450 reductase protein, variant or fragment
 - (i) comprises one or more conservative amino acid substitutions; and/or
 - (ii) comprises amino acids 57-678 of Fig 2 (SEQ ID No 2); and/or
 - (iii) has at least 90% amino acid identity to 57-678 of Fig 2 (SEQ ID No 2) over its full length.
5. A fusion protein according to claim 3 or claim 4 wherein the CYP2B6 protein is upstream of the NADPH-cytochrome P450 reductase.
6. A fusion protein according to any one of claims 1 to 4, wherein the mutant human CYP2B6 protein and the NADPH-cytochrome P450 reductase are separated by a linker.
7. A fusion protein according to claim 6, wherein the linker consists of 1 to 10 amino acids, and optionally wherein the linker comprises Ser_nThr, wherein n = 1 to 7, optionally 3 or 5.
8. A fusion protein according to claim 7 which has the sequence of Fig 3 (SEQ ID No 3).
9. An isolated nucleic acid encoding a protein according to claim 1 or claim 2 or a fusion protein according to any one of claims 3 to 8.

10. A vector comprising the nucleic acid of claim 9, wherein the vector is optionally a viral vector, optionally a lentiviral vector, and/or wherein the vector is optionally an expression vector.

5

11 A host cell comprising the vector of claim 10.

12. A method of making a fusion protein according to any one of claims, comprising culturing the host cell of claim 11 in conditions suitable for expression of said protein, and optionally purifying said protein from the cell culture.

10

13. A protein according to claim 1 or claim 2, or a fusion protein according to any one of claims 3 to 9, or a vector according to claim 10, for use in a method of treatment of the human or animal body.

15

14. The protein or vector according to claim 13 for use according to claim 13, wherein (i) said protein or vector is administered in combination with a prodrug, either simultaneously or sequentially, wherein the prodrug is optionally cyclophosphamide; and/or

20

(ii) said treatment is treatment of cancer, optionally a cancer of the head and neck, leukaemia, lymphoma, gliosarcoma, pancreatic cancer, breast cancer and melanoma..

15. A method of treatment of cancer comprising administering a protein according to claim 1 or claim 2, or a fusion protein according to any one of claims 3 to 9, or a vector according to claim 10, to a patient, in combination with a chemotherapeutic agent, either sequentially or simultaneously.

25

1/10

1 melsvllfla lltglllllv qrhpnthdri ppgprplpll gnllqmdrrg llksflrfre
61 kygdvftvhl gprpvvmlcg veairealvd kaeafsgrgk iamvdpffrg ygvvfangnr
121 wkvlrrfsvt tmrdfgmgkr sveeriqeea qclieelrks kgalmdptfl fqsitaniic
181 sivfgkrfhy qdqeflkmnn lfyqtfslls svfgqlfelf sgflkyfpga hrqvyknlqe
241 inayighsve khretldpsa pkdlidtyll hmekeksnah sefshqnlnl ntlslffagt
301 ettsttlyrg flmlkypvh aervyrieiq vigphrppel hdrakmpyte aviyeiqrfs
361 dllpmgvphi vtqhtsfrgy iipkdtevfll ilstalhdph yfekpdafnp dhfldangal
421 kkteafipfs lgkriclgeg iaraelflff ttilqnfmsa spvapedidl tpqecgwgki
481 pptyqirflp r

FIG.1

1 minmgdshvd tsstvseava eevslfsmt d milfslivgl ltywflfrkk keevpeftki
61 qtltsvres sfvekmkktg rniivfygsq tgtaeefanr lskdahrygm rgmsadpeey
121 dladlsslpe idnalvvfcm atygegdptd naqdfydwlg etdvdlsgvk favfglgnkt
181 yehfnamgky vdkrleqlga qrifelglgd ddgnleedfi twreqfwpav cehtgveatg
241 eessirqyel vvhtdidaak vymgemgrlk syenqkppfd aknpflaavt tnrklnqgte
301 rhlmhleldi sdskiryesg dhvavypand salvnqlgki lgadldvms lnnldeesnk
361 khpfpcpsy rtalyyldi tnprrtnvly elaqyaseps eqellrkmas ssggekelyl
421 swvvearrhi lailqdcpsl rppidhlcel lprlqaryys iassskvhpn svhicavvve
481 yetkagrink gvatnwlrak epagenggra lvpmfvrksq frlpfkattp vimvgpgtg
541 apfigfiqer awlrqqgkev getllyygcr rsdedylyre elaqfhrdga ltqlnvafsr
601 eqshkvyvqh llkqdrehlw klieggahiy vcgdarnmar dvqntfydiv aelgamehaq
661 avdyikklmt kgryslvws

FIG.2

2/10

1 melsvllfla lltglllllv qrhpnthdrl ppgprplpll gnllqmdrrg llksflrfre
 61 kygdvftvhl gprpvvmcgc veairealvd kaeafsgrgk iamvdpffrg ygvvfangnr
 121 wkvlrrfsvt tmrdfgmgkr sveerigeea qclieelrks kgalmdptfl fqsitaniic
 181 sivfgkrfhy qdqeflkmmn lfyqtfslis svfgqlfelf sgflkyfpga hrqvyknlqe
 241 inayighsve khretldpsa pkdlidtyll hmekeksnah sefshqnlnl ntlslffagt
 301 ettsttlryg fllmlkyphv aervyreieq vigphrppel hdrakmpyte aviyeiqrfs
 361 dllpmgvphi vtqhtsfrgy iipkdtevfll ilstalhdph yfekpdafnp dhfldangal
 421 kkteafipfs lgkriclgeg iaraelflff ttilqnfsmas spvapedidl tpqecgwski
 481 pptyqirflp sssstsmtd milfslivgl ltywflfrkk keevpeftki qltssvres
 541 sfvekmkktg rniivfygsq tgtaeefanr lskdahrygm rgmsadpeey dladlsslpe
 601 idnalvvfcm atygedpdt naqdfydwlq etdvdlsqvk favfglgnkt yehfnamgky
 661 vdkrleqlga qrifelglgd ddgnleedfi twreqfwpav ceahfgveatg eessirqyel
 721 vvhtdidaak vymgemgrlk syengkppfd aknpflaavt trnklnqgte rhlmhleldi
 781 sdskiryesg dhvavypand salvnqlgki lgadldvms lnnldeesnk khpfpcptsy
 841 rtaltyyldi tnprrtnvly elaqyaseps egellrkmas ssggekelyl swvvearrhi
 901 lailqdcpsl rppidhlcel lprrlqaryys iassskvhpn svhicavvve yetkagrink
 961 gvatnwlrak epagenggra lvpmfvrksq frlpfkattp vimvgpgtgav apfigfiger
 1021 awlrqqgkev getllyygc rdedylyre elaqfhrdga ltqlnvafsr eqshkvyvqh
 1081 llkqdrehlw klieggahiy vcgdarnmar dvqntfydiv aelgamehaq avdyikkmt
 1141 kgryslv

FIG.3

1 melsvllfla lltglllllv qrhpnthdrl ppgprplpll gnllqmdrrg llksflrfre
 61 kygdvftvhl gprpvvmcgc veairealvd kaeafsgrgk iamvdpffrg ygvvfangnr
 121 wkvlrrfsvt tmrdfgmgkr sveerigeea qclieelrks kgalmdptfl fqsitaniic
 181 sivfgkrfhy qdqeflkmln lfyqtfslis svfgqlfelf sgflkyfpga hrqvyknlqe
 241 inayighsve khretldpsa pkdlidtyll hmekeksnah sefshqnlnl ntlslffagt
 301 ettsttlryg fllmlkyphv aervyreieq vigphrppel hdrakmpyte aviyeiqrfs
 361 dllpmgvphi vtqhtsfrgy iipkdtevfll ilstalhdph yfekpdafnp dhfldangal
 421 kkteafipfs lgkriclgeg iaraelflff ttilqnfsmas spvapedidl tpqecgwski
 481 pptyqirflp r

FIG.4

Ile 57 Reductase

1S+1T CGC TCG ACG ATT CAG ACA
 2S CGC TCG AGC ATT CAG ACA
 2S+1T CGC TCG AGC ACG ATT CAG ACA
 3S+1T CGC TCG AGT TCA ACG ATT CAG ACA
 4S+1T CGC TCG AGT AGT TCT ACG ATT CAG ACA
 5S+1T CGC TCG AGT TCT AGT TCT ACG ATT CAG ACA
 6S+1T CGC TCG AGT AGT TCT AGT TCT ACG ATT CAG ACA
 7S+1T CGC TCG AGT TCT AGT TCT AGT TCT ACG ATT CAG ACA

CYP2B6 arg490

XhoI
 CTG CCC CGC TCG AGC
 leu pro arg ser

Xho I or Sal I digestion

Ligation

CYP2B6

CTG CCC CGC
 leu pro arg

Linkers

- 1 ser + 1 thr
- 2 ser
- 2 to 7 ser + 1 thr

CYP2B6
 Linker
 Linker

(amino acids 1-490)

(2 to 8 amino acids)

Reductase

ATT CAG ACA
 ile gln thr

Reductase

(amino acids 57-678)

FIG.5

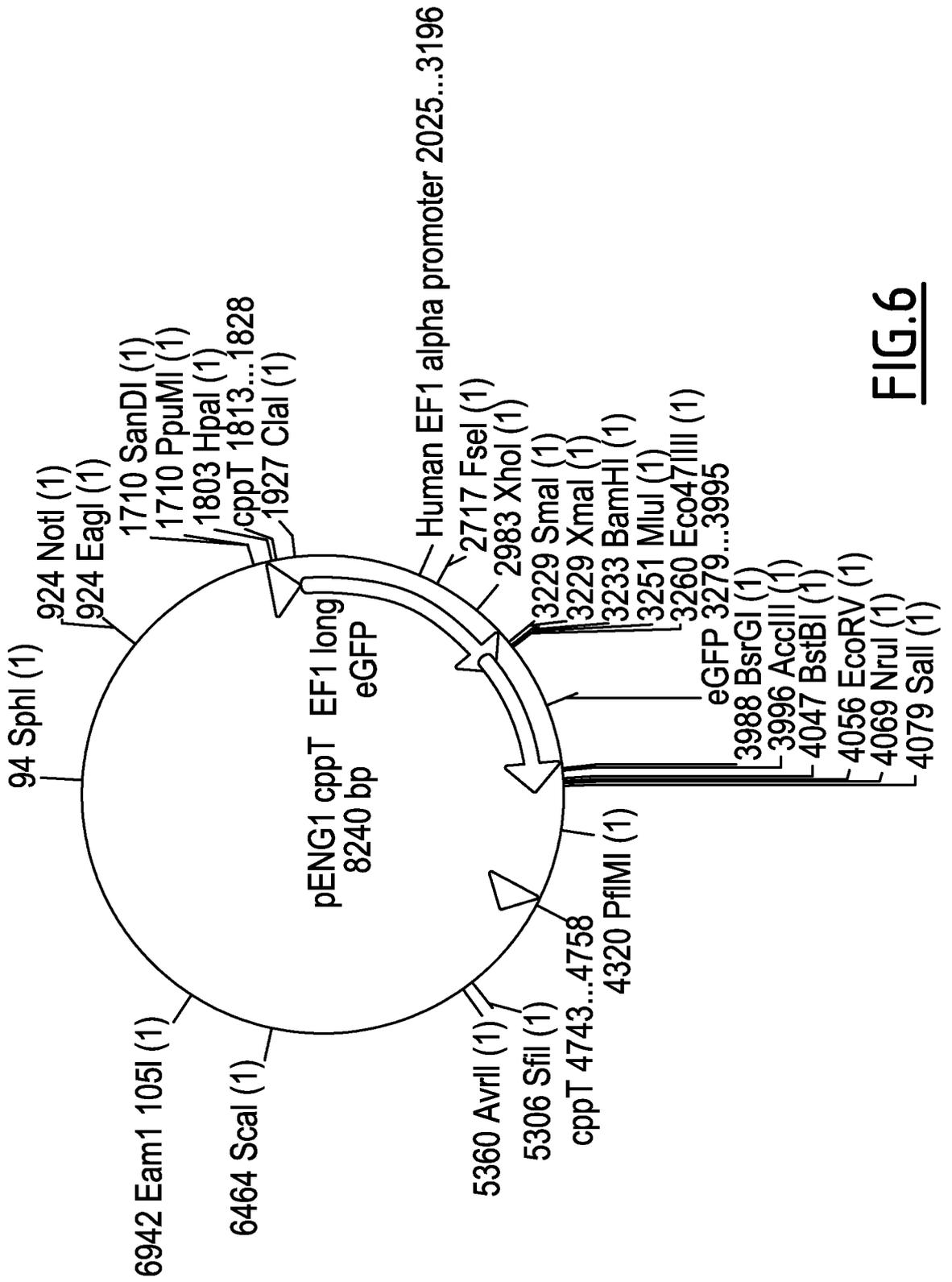
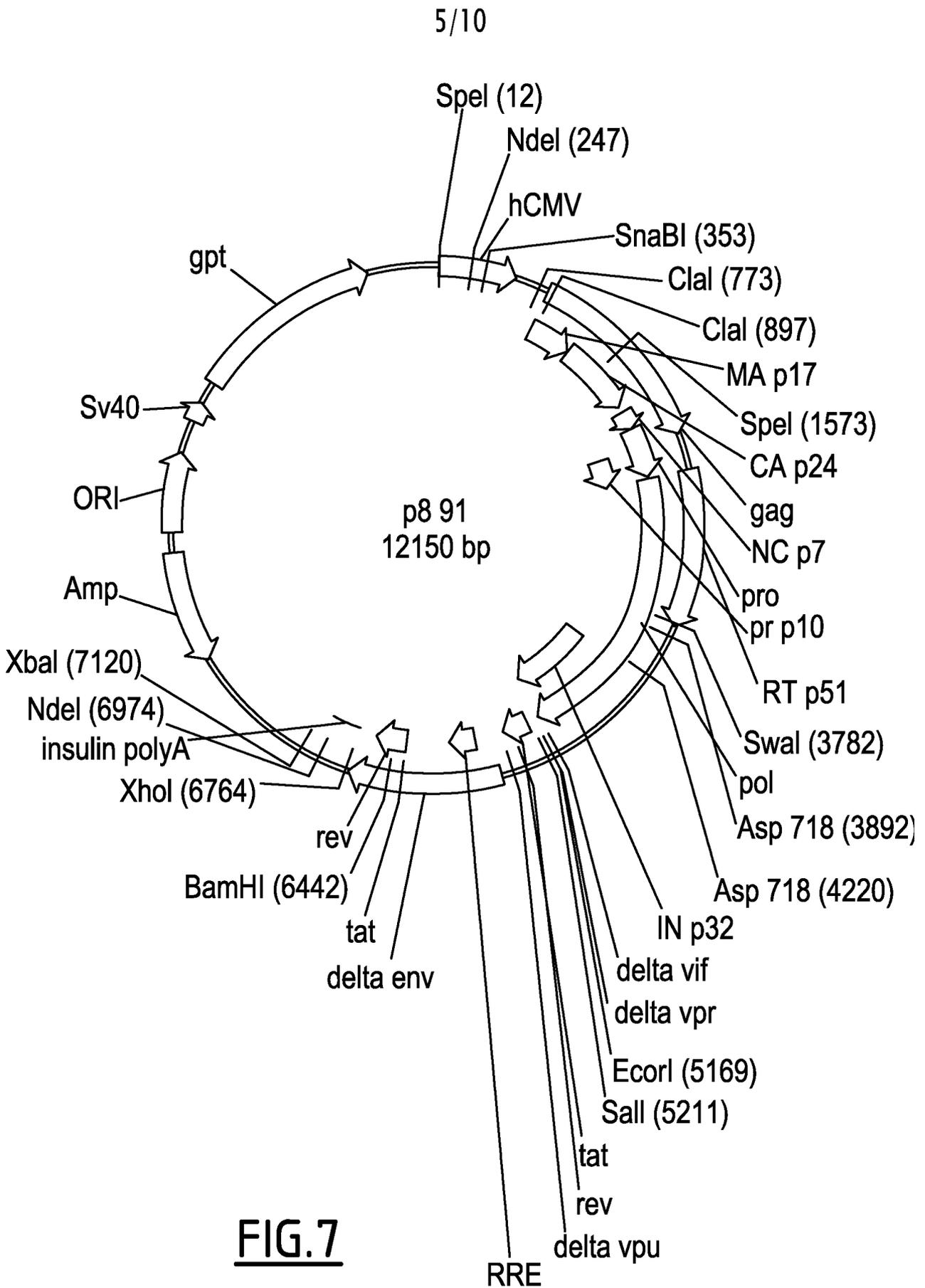


FIG.6



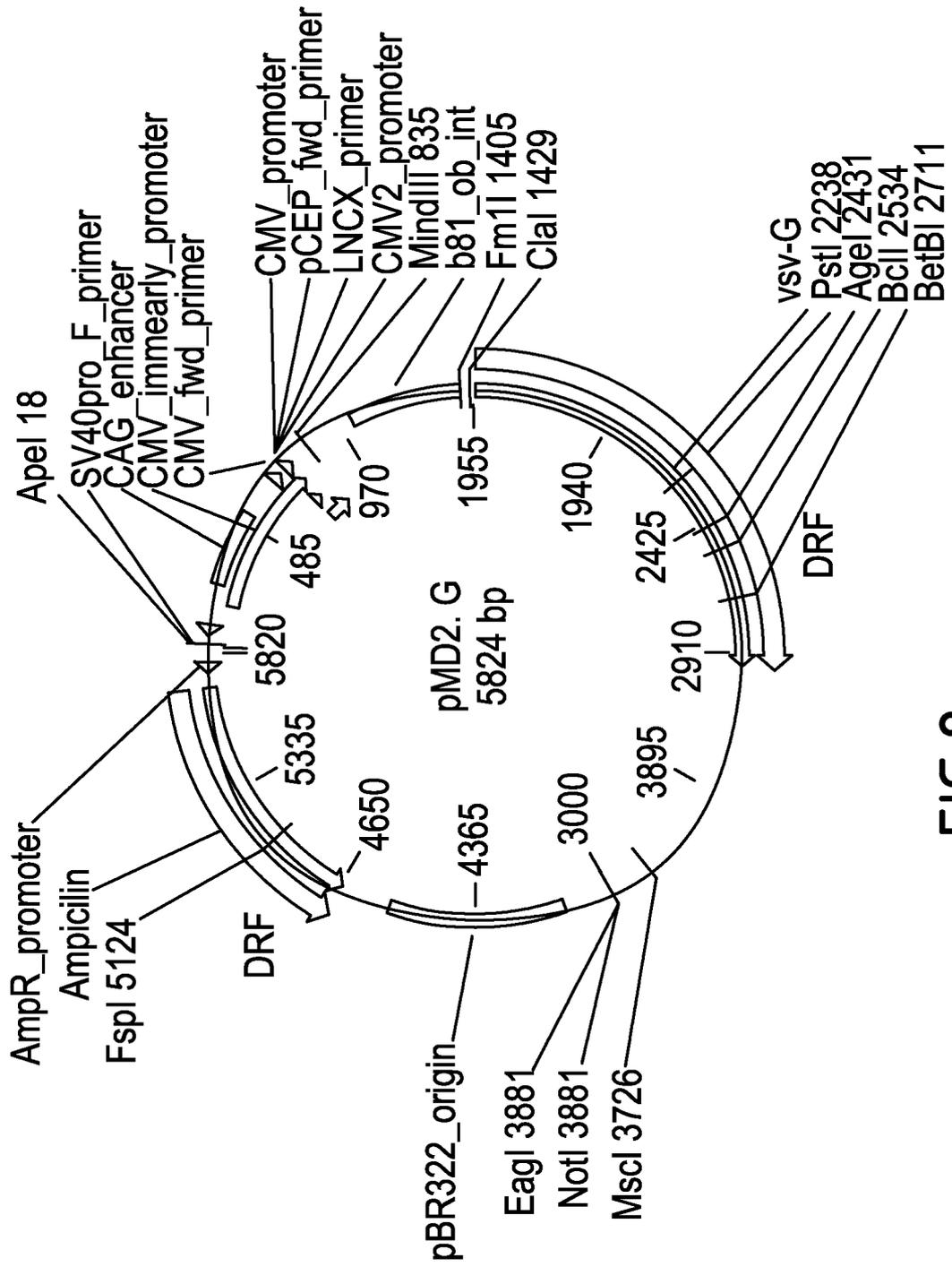


FIG.8

7/10

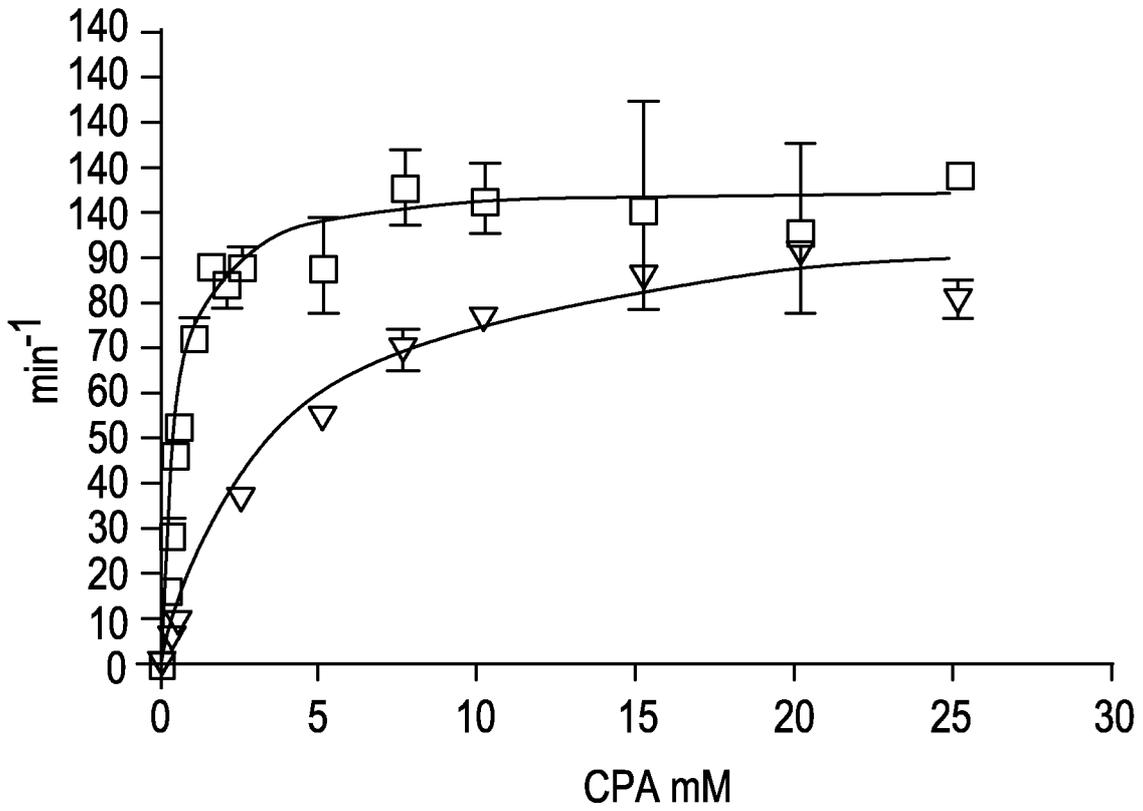


FIG.9

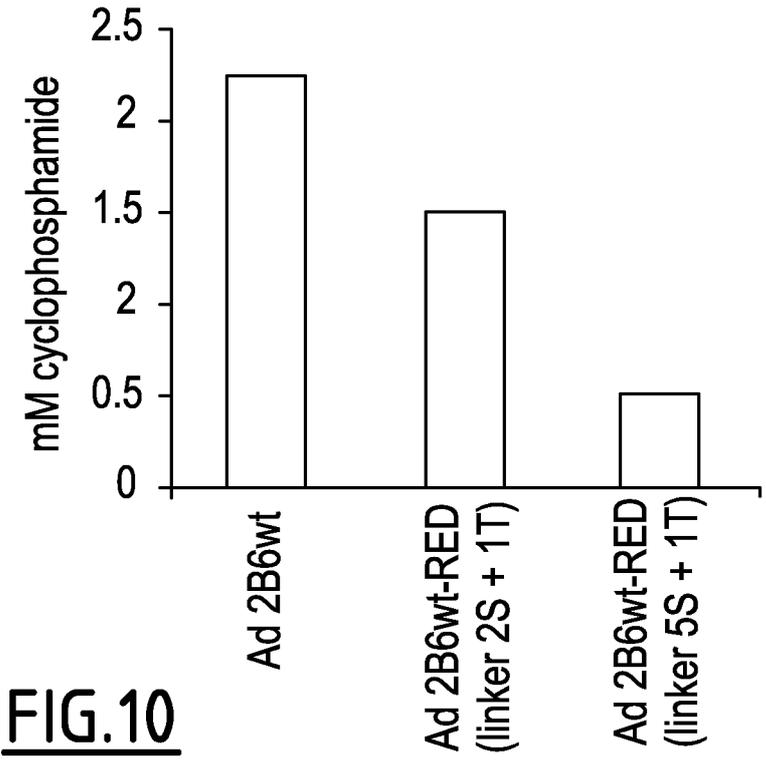


FIG.10

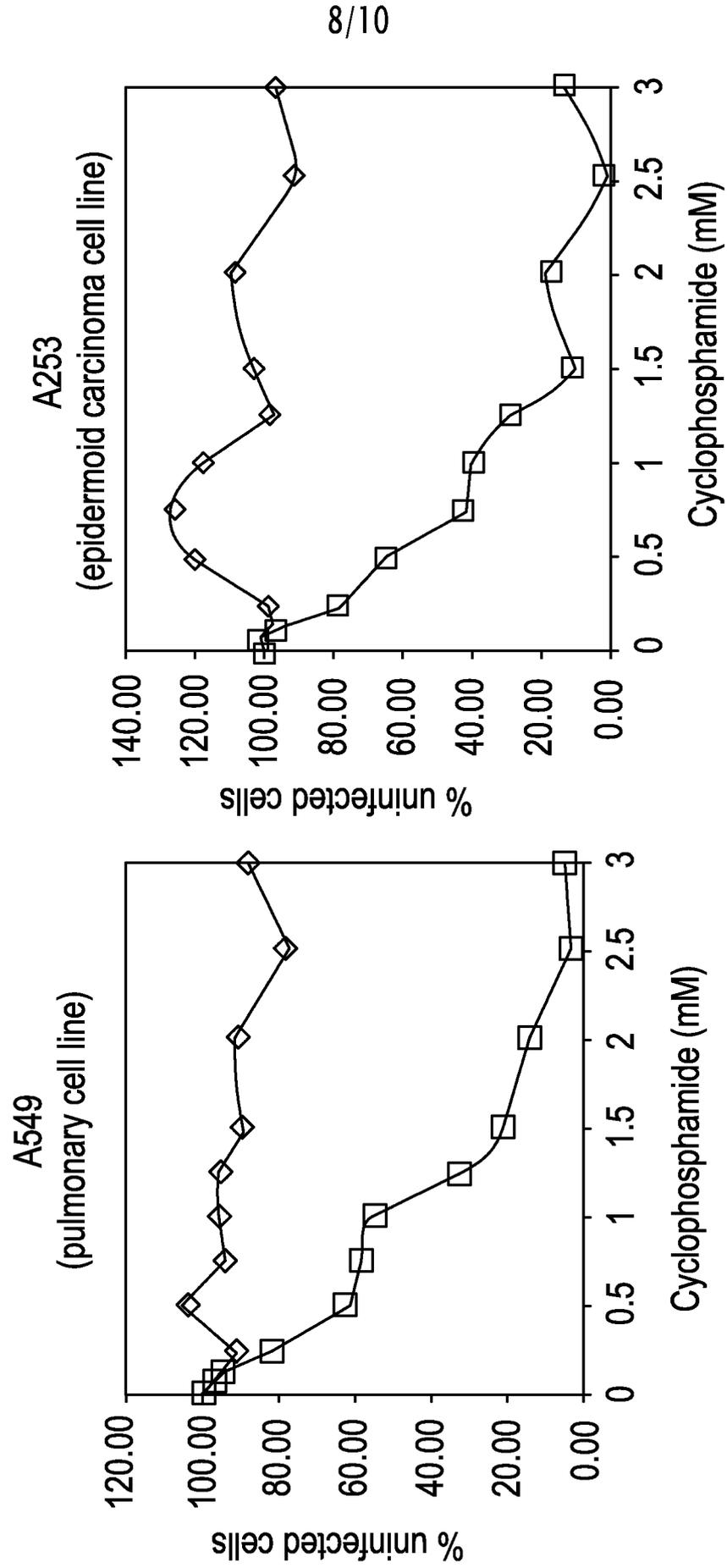


FIG.11

9/10

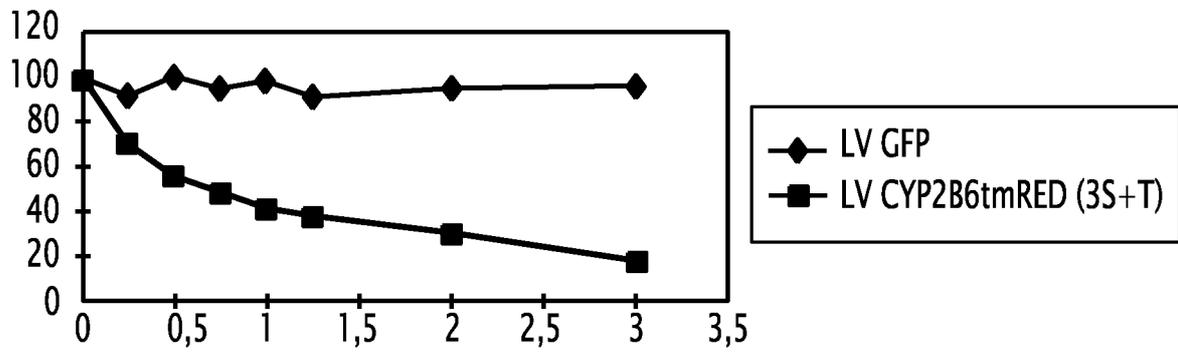


FIG.12

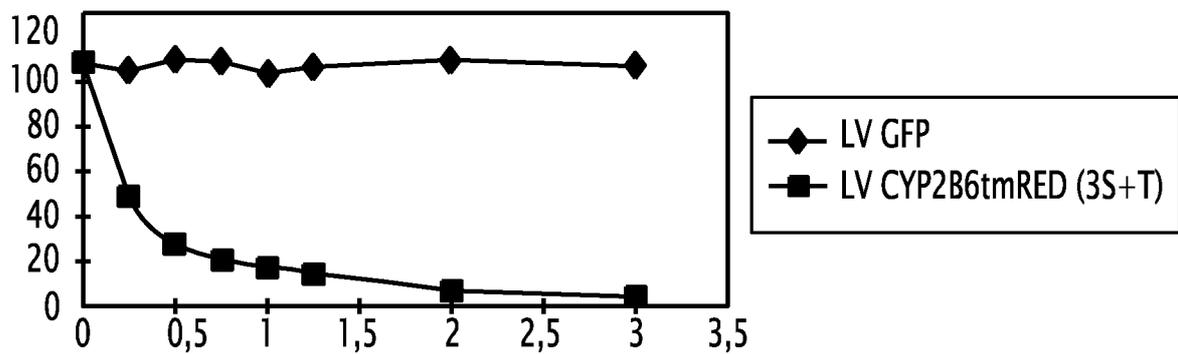


FIG.13

10/10

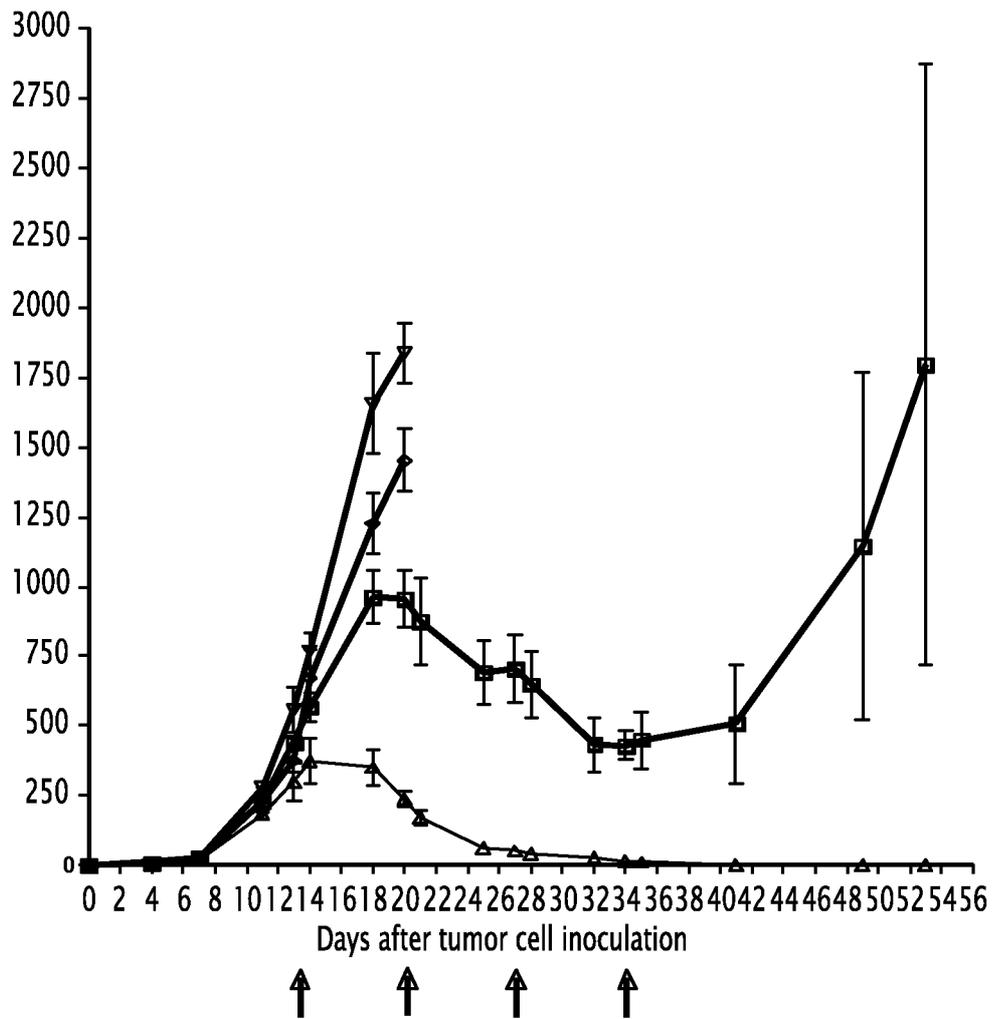


FIG.14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/058219

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C07K14/80 C12N9/02 C12N9/00
 ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NGUYEN THIEN-AN ET AL: "Improvement of cyclophosphamide activation by CYP2B6 mutants: From in silico to ex vivo", April 2008 (2008-04), MOLECULAR PHARMACOLOGY, VOL. 73, NR. 4, PAGE(S) 1122-1133 URL, XP002657688, ISSN: 0026-895X the whole document	1-15
A	WO 01/59152 A2 (EPIDAUROS BIOTECHNOLOGIE AG [DE]; ZANGER ULRICH M [DE]; LANG THOMAS [D] 16 August 2001 (2001-08-16) the whole document	1-15

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search 21 August 2012	Date of mailing of the international search report 29/08/2012
---	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Meyer, Wolfram
--	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/058219

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0159152	A2	16-08-2001	
		AT 453725 T	15-01-2010
		AU 3925701 A	20-08-2001
		DK 1272663 T3	26-04-2010
		EP 1272663 A2	08-01-2003
		ES 2338523 T3	10-05-2010
		PT 1272663 E	01-03-2010
		US 2004224313 A1	11-11-2004
		US 2009311696 A1	17-12-2009
		WO 0159152 A2	16-08-2001

ANNEXE II : POLYMORPHISMES DU CYP2B6

Le tableau qui suit récapitule les différents allèles du CYP2B6.

Tableau Récapitulatif des allèles du CYP2B6

CYP2B6 allele nomenclature

<i>Allele</i>	<i>Protein</i>	<i>Nucleotide changes</i>		<i>Effect</i>	<i>Enzyme activity</i>		<i>References</i>
		<i>cDNA</i>	<i>Gene</i>		<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	
<i>CYP2B6*1A</i>	CYP2B6.1				Normal	Normal	Yamano et al., 1989
<i>CYP2B6*1B</i>	CYP2B6.1		-2320T>C				Lamba et al., 2003
<i>CYP2B6*1C</i>	CYP2B6.1		-2320T>C; 14593C>G; 15582C>T				Lamba et al., 2003
<i>CYP2B6*1D</i>	CYP2B6.1		-1778A>G; - 1186C>G; 12917A>T				Lamba et al., 2003
<i>CYP2B6*1E</i>	CYP2B6.1		-1578C>T; - 757C>T				Lamba et al., 2003
<i>CYP2B6*1F</i>	CYP2B6.1		-1224A>G				Lamba et al., 2003
<i>CYP2B6*1G</i>	CYP2B6.1		-750T>C				Lamba et al., 2003
<i>CYP2B6*1H</i>	CYP2B6.1		-2320T>C; - 750T>C				Hesse et al., 2004
<i>CYP2B6*1J</i>	CYP2B6.1		-2320T>C; - 1778A>G; - 1186C>G; - 750T>C				Hesse et al., 2004
<i>CYP2B6*1K</i>	CYP2B6.1		-1972C>T; - 1578C>T; - 750T>C				Hesse et al., 2004
<i>CYP2B6*1L</i>	CYP2B6.1		-1578C>T; - 750T>C				Hesse et al., 2004
<i>CYP2B6*1M</i>	CYP2B6.1		-1578C>T				Hesse et al., 2004
<i>CYP2B6*1N</i>	CYP2B6.1		-1456T>C; - 750T>C				Hesse et al., 2004
<i>CYP2B6*2A</i>	CYP2B6.2	64C>T	64C>T	R22C			Lang et al., 2001
<i>CYP2B6*2B</i>	CYP2B6.2	64C>T ; 216G>C	64C>T ; 12740G>C	R22C			Lamba et al., 2003
<i>CYP2B6*3</i>	CYP2B6.3	777C>A	18045C>A	S259R			Lang et al., 2001
<i>CYP2B6*4A</i>	CYP2B6.4	785A>G	18053A>G	K262R			Lang et al., 2001
<i>CYP2B6*4B</i>	CYP2B6.4	785A>G	-2320T>C; - 1778A>G; - 1186C>G; - 750T>C	K262R			Hesse et al., 2004

			750T>C; 18053A>G				
<i>CYP2B6*4C</i>	CYP2B6.4	785A>G	18053A>G ; 12917A>T	K262R			Jacob et al. 2004
<i>CYP2B6*4D</i>	CYP2B6.4	785A>G	-1456T>C; - 750T>C; 18053A>G	K262R			Zukunft et al. 2005
<i>CYP2B6*5A</i>	CYP2B6.5	1459C>T	25505C>T	R487C			Lang et al. 2001
<i>CYP2B6*5B</i>	CYP2B6.5	1459C>T	-2320T>C; - 750T>C; 25505C>T	R487C			Hesse et al. 2004
<i>CYP2B6*5C</i>	CYP2B6.5	1459C>T	-591A>G; 25505C>T	R487C			Zukunft et al. 2005
<i>CYP2B6*6A</i>	CYP2B6.6	516G>T ; 785A>G	15631G>T ; 18053A>G	Q172H ; K262R			Lang et al. 2001
<i>CYP2B6*6B</i>	CYP2B6.6	516G>T ; 785A>G	-1456T>C; - 750T>C; 15631G>T ; 18053A>G	Q172H ; K262R			Hesse et al. 2004
<i>CYP2B6*6C</i>	CYP2B6.6	516G>T ; 785A>G	-750T>C; 15631G>T ; 18053A>G	Q172H ; K262R			Zukunft et al. 2005
<i>CYP2B6*7A</i>	CYP2B6.7	516G>T ; 785A>G 1459C>T	15631G>T ; 18053A>G ; 25505C>T	Q172H ; K262R ; R487C			Lang et al. 2001
<i>CYP2B6*7B</i>	CYP2B6.7	516G>T ; 785A>G 1459C>T	-1456 T>C; - 750T>C; 15631G>T ; 18053A>G ; 25505C>T	Q172H ; K262R ; R487C			Hesse et al. 2004
<i>CYP2B6*8</i>	CYP2B6.8	415A>G	13072A>G	K139E		Decr. expr.	Lamba et al. 2003 Lang et al. 2004
<i>CYP2B6*9</i>	CYP2B6.9	516G>T	-1456T>C; 15631G>T ; 21563C>T	Q172H			Lamba et al. 2003
<i>CYP2B6*10</i>	CYP2B6.10	62A>T; 64C>T ; 216G>C	62A>T; 64C>T ; 12740G>C	Q21L; R22C			Lang et al. 2004
<i>CYP2B6*11A</i>	CYP2B6.11	136A>G	136A>G	M46V		Decr. expr.	Lang et al. 2004
<i>CYP2B6*11B</i>	CYP2B6.11	136A>G	136A>G ; 18273G>A	M46V		Decr. expr.	Lang et al. 2004
<i>CYP2B6*12 Tentative allele</i>	CYP2B6.12	296G>A	12820G>A ; 18273G>A	G99E		Decr. expr.	Lang et al. 2004
<i>CYP2B6*13A</i>	CYP2B6.13	415A>G ; 516G>T ; 785A>G	13072A>G ; 15631G>T ; 18053A>G ; 18273G>A; 21563C>T	K139E ; Q172H ; K262R		Decr.?	Lang et al. 2004

<i>CYP2B6*13B</i>	CYP2B6.13	415A>G ; 516G>T ; 785A>G	13072A>G ; 15582C>T; 15631G>T ; 18053A>G ; 18273G>A; 21563C>T	K139E ; Q172H ; K262R		Decr.?	Lang et al. 2004
<i>CYP2B6*14 Tentative allele</i>	CYP2B6.14	419G>A	13076G>A ; 18273G>A	R140Q		Decr. act.	Lang et al. 2004
<i>CYP2B6*15A</i>	CYP2B6.15	1172T>A	15582C>T; 21388T>A	I391N		Decr. expr.	Lang et al. 2004
<i>CYP2B6*15B</i>	CYP2B6.15	1172T>A	15582C>T; 18273G>A; 21388T>A	I391N		Decr. expr.	Lang et al. 2004
<i>CYP2B6*16</i>	CYP2B6.16	785A>G ; 983T>C	18053A>G ; 21011T>C	K262R ; I328T	Decr.	Decr. expr.	Wang et al., in press, Pharmacogenet Genomics
<i>CYP2B6*17A</i>	CYP2B6.17	76A>T; 83A>G; 85C>A; 86G>C; 933C>T	76A>T; 83A>G; 85C>A; 86G>C; 18273G>A; 18799C>T	T26S; D28G; R29T			Klein et al. 2005
<i>CYP2B6*17B</i>	CYP2B6.17	76A>T; 83A>G; 85C>A; 86G>C	76A>T; 83A>G; 85C>A; 86G>C; 18273G>A	T26S; D28G; R29T			Klein et al. 2005
<i>CYP2B6*18</i>	CYP2B6.18	983T>C	17897C>T; 18273G>A; 18627G>A; 21011T>C	I328T		Decr. expr.	Klein et al. 2005
<i>CYP2B6*19</i>	CYP2B6.19	516G>T ; 785A>G ; 1006C>T	15631G>T ; 18053A>G ; 18273G>A; 21034C>T ; 21563C>T	Q172H ; K262R ; R336C		Decr. expr.	Klein et al. 2005
<i>CYP2B6*20</i>	CYP2B6.20	503C>T ; 516G>T ; 785A>G ;	15618C>T ; 15631G>T ; 18053A>G ; 18273G>A	T168I ; Q172H ; K262R		Decr. expr.	Klein et al. 2005
<i>CYP2B6*21</i>	CYP2B6.21	1282C>A	18273G>A; 21498C>A	P428T		Decr. expr.	Klein et al. 2005
<i>CYP2B6*22</i>	CYP2B6.1		-1848C>A; - 801G>T; - 750T>C, - 82T>C	Incr. transcr.		Incr. expr.	Zukunft et al. 2005
<i>CYP2B6*23</i>	CYP2B6.23	1375A>G	25421A>G				Hiratsuka et al. 2004
<i>CYP2B6*24</i>	CYP2B6.24	1427G>A	25473G>A				Hiratsuka et al. 2004
<i>CYP2B6*25</i>	CYP2B6.25	1454A>T	25500A>T				Hiratsuka et al. 2004
Additional SNPs, where the haplotype has not yet been determined							

			18000C>T				Lang et al., 2001
			17808G>A; 18273A>G; 18604G>A				Saito et al., 2003
			297C>T; 365T>A; 12940delAG; 13198T>A; 15290T>G; 15414G>A; 15415C>A; 15482C>T; 15577C>G; 15794G>A; 17522A>T; 17670G>A; 17755G>C; 17897C>T; 18166G>C; 18627G>A; 18674C>T; 25548G>A; 25660C>A; 25866T>A; 25867A>G; 25883A>G; 26147C>G; 26594G>T; 26777G>A; 26921A>C; 26922G>A				Solus et al., 2004
			21011T>C	I328T			Solus et al., 2004
			15614C>G	P167A			NCBI dbSNP

Exons	Contrôle A	Contrôle B	Burkitt
1	Pas de mutation	Pas de mutation	Pas de mutation
2	G216C en position hétérozygote pas de changement d'acide aminé	Pas de mutation	Pas de mutation
3	Pas de mutation	Pas de mutation	Pas de mutation
4	G516T hétérozygote Mutation de l'acide aminé glycine 172 en histidine	Pas de mutation	Pas de mutation
5	A785G hétérozygote Mutation de l'acide aminé lysine 262 en arginine	A785G hétérozygote Mutation de l'acide aminé lysine 262 en arginine	Pas de mutation
6	Pas de mutation	Pas de mutation	Pas de mutation
7	Pas de mutation	Pas de mutation	Pas de mutation
8	Pas de mutation	Pas de mutation	Pas de mutation
9	C1459T hétérozygote	Pas de mutation	
	Mutation de l'acide aminé arginine 487 en cystéine	Pas de mutation	Mutation de l'acide aminé arginine 487 en cystéine
Allèle (d'après Lang et al., 2001)	2B6*7	2B6*4	2B6*5

Tableau 8 : Génotypage du CYP2B6 dans une lignée de lymphome de Burkitt

Des variations de métabolisme en fonction des polymorphismes pourraient expliquer les différences de réponse au CPA. Ainsi dans le lymphome de Burkitt, dont le traitement principal est le cyclophosphamide, environ la moitié des patients ne répond pas au traitement (Traore et al., 2011). A ce jour, aucune étude n'a réussi à expliquer ces différences.

A partir d'une lignée cellulaire de lymphome de Burkitt humain (GA-10 ; ATCC : CRL-2392) résistant au CPA, nous avons extrait l'ADN et génotypé tous les exons du CYP2B6. L'allèle exprimé dans cette lignée est l'allèle 2B6*5 (**tableau 8**).

Aucune étude épidémiologique n'a pu montré un effet de ce polymorphisme dans le métabolisme du CPA, les fréquences ayant toujours été trop faibles. Cependant un travail, présenté en 2011 lors de *l'Annual meeting for the society of research on nicotine and Tobacco* (Zhu et al., 2011) (Toronto, Canada), a étudié l'expression de différents allèles du CYP2B6, dans *Escherichia Coli*, par Western Blot. Les résultats ont montré une très faible expression (quasi nulle) du CYP2B6*5 par rapport aux autres allèles (CYP2B6*1, *4, *6). Cette très faible expression du CYP2B6 pourrait correspondre à une très faible activation du CPA, et expliquer la résistance du patient au traitement. Une étude des polymorphismes du CYP2B6 sur un large échantillon de patients atteints de lymphome de Burkitt résistants ou non au cyclophosphamide permettrait d'identifier d'éventuels polymorphismes responsables de la résistance au traitement.

ANNEXE III : L'EFFET *BYSTANDER* DANS LA GDEPT

Le faible pourcentage de cellules transduites, et donc de cellules capables de métaboliser la prodrogue en métabolites cytotoxiques, est un obstacle pour la GDEPT. Pour que la technique soit efficace, des mécanismes permettent de contourner cet obstacle, en particulier l'effet *bystander* ou effet de voisinage.

I. L'EFFET *BYSTANDER*

L'effet de voisinage (ou de proximité), encore appelé *bystander*, entraîne la mort de cellules tumorales qui n'expriment pas le transgène ; avec le passage des métabolites toxiques des cellules qui expriment le transgène vers les cellules qui ne l'expriment pas. Ce passage se fait notamment par diffusion et/ou *via* les jonctions communicantes.

On retrouve beaucoup de travaux dans la littérature ayant étudié l'effet *bystander* dans la GDEPT, car il joue potentiellement un rôle clé dans la réussite du traitement. De manière générale, ces études démontrent qu'en fonction de la nature chimique des métabolites cytotoxiques, l'une et/ou l'autre de ces deux voies est impliquée.

I.1 EFFET *BYSTANDER* PASSANT PAR LA DIFFUSION PASSIVE DANS LA GDEPT

La diffusion passive de molécules entre cellules se fait suivant un gradient de concentration. Comme son nom l'indique, il s'agit d'un phénomène qui ne consomme pas d'énergie et qui n'est pas saturable. Les principaux critères entrant en jeu dans la diffusion passive sont : la taille de la molécule, le caractère lipophile de la molécule, l'état d'ionisation et le gradient de concentration.

Ainsi par exemple, la famille des oxazaphosphorines activées par les CYP, le CB1954 activé par la nitroréductase produiront des métabolites actifs, capables de diffuser librement à travers les membranes cellulaires et d'exercer leurs effets cytotoxiques sur les cellules adjacentes (Wei et al., 1995) (Chen and Waxman, 1995) (Friedlos et al., 1998) (Gunther et al., 2006).

I.2 EFFET *BYSTANDER* PASSANT PAR LES JONCTIONS COMMUNICANTES DANS LA GDEPT

Les jonctions communicantes ou « Gap junction » sont des groupes de canaux membranaires (« plaques jonctionnelles ») qui permettent l'échange direct de petites molécules (<1 kDa comme des ions, des seconds messagers : AMPc, Inositol triphosphate, acides aminés, sucres, nucléotides) entre les cytoplasmes de deux cellules voisines, en créant un couplage électrique et métabolique dans une grande variété de cellules et de tissus (à l'exception des plaquettes, des érythrocytes, des cellules musculaires et des spermatozoïdes) (Goodenough and Paul, 2009). Ces canaux « jonctionnels » se forment par la juxtaposition de deux hémicanaux transmembranaires (ou connexons) émis à partir de chacune des cellules adjacentes (Bruzzone et al., 1996). Ces connexons sont formés de six protéines transmembranaires appelées connexines (Cx) (Sohl and Willecke, 2003) et présentent une forte homologie entre elles à l'exception de leur boucle intracellulaire et leur partie C-terminale. Cette variabilité dans le nombre d'acides aminés de leur région C-terminale conduit à des variations de poids moléculaire des connexines (entre 20 kDa et 60 kDa) et donne la nomenclature utilisée pour désigner chaque connexine ; par exemple la connexine 43 (Cx 43) a un poids moléculaire de 43 kDa. Dans le poumon sain, les formes majoritairement exprimées sont les Cx26, Cx32, Cx43 (Kar et al., 2012).

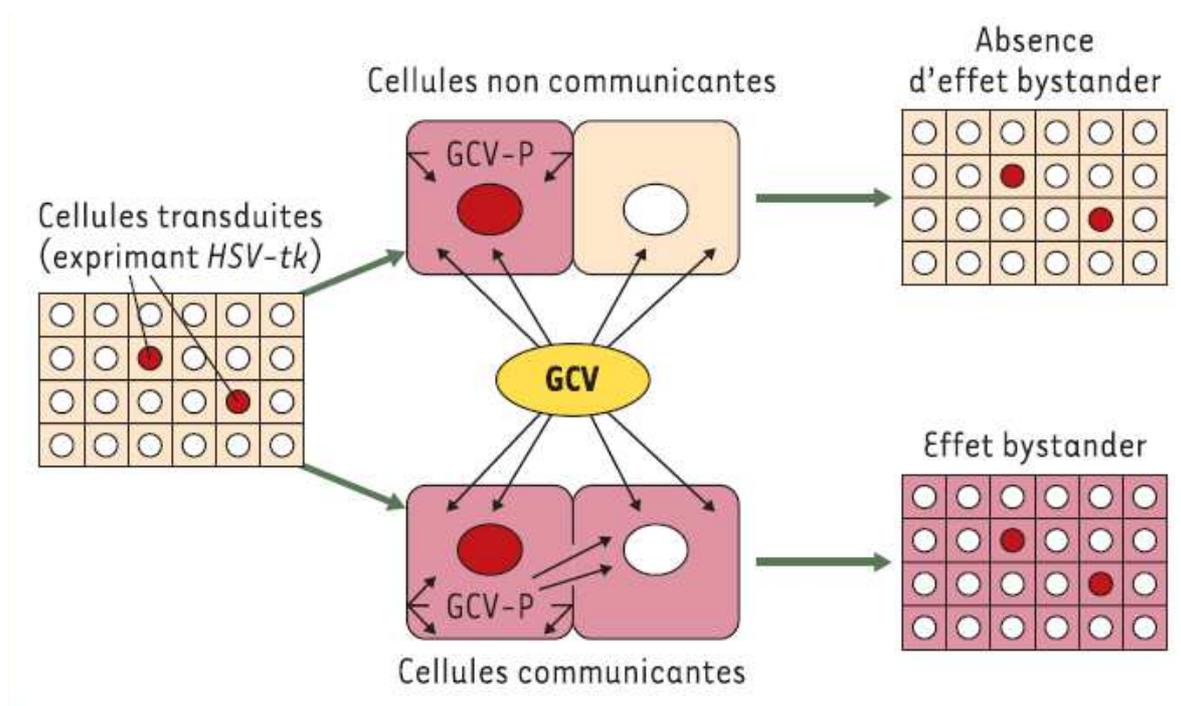


Figure 34 : Effet *bystander* sur des cellules non transduites : exemple de HSV-tk

(D'après Mesnil et al, 2004)

La toxicité dans les cellules (cytoplasme rouge) ne se limite pas à la cellule transduite (cellule au noyau rouge) mais atteint aussi les cellules voisines (cellules au noyau blanc). Les jonctions communicantes augmentent cet effet.

Ici les cellules ayant des jonctions communicantes fonctionnelles vont avoir un effet *bystander* alors que celles n'ayant pas de jonctions communicantes n'auront pas d'effet *bystander*.

L'hypothèse d'une implication des jonctions communicantes dans ce phénomène d'effet de proximité a été suggérée pour la première fois dans des thérapies suicides utilisant le gène de la thymidine kinase associé à un traitement au ganciclovir. En effet, les métabolites du ganciclovir sont phosphorylés et ne peuvent pas diffuser de manière passive mais ont la taille requise (< 1 kDa) pour passer au travers des jonctions communicantes et exercer sa toxicité aux cellules adjacentes (Goldberg and Bertram, 1994) (Pitts, 1994). Par la suite, cette hypothèse a été vérifiée *in vitro* en mélangeant des cellules de fibrosarcomes exprimant ou non la thymidine kinase (Bi et al., 1993) ou des fibroblastes exprimant la thymidine kinase et des lignées cellulaires tumorales ne l'exprimant pas (Fick et al., 1995). D'autres études ont renforcé l'idée de l'implication des jonctions communicantes dans l'effet *bystander* du traitement au ganciclovir par la transfection des gènes de connexine dans des cellules tumorales (Mesnil et al., 1996) (Elshami et al., 1996). L'équipe de Mesnil a montré qu'en transfectant des cellules tumorales HeLa (n'exprimant pas de connexines endogènes) avec le gène de la Cx 43, on observait une élimination quasi complète des cellules HeLa même si seulement 10 % des cellules HeLa « rendue communicantes » exprimaient le gène de la thymidine kinase. Les auteurs en ont conclu que 90 % des cellules normalement insensibles au ganciclovir l'étaient devenues par l'établissement de jonctions communicantes et donc d'une communication intercellulaire directe (Mesnil et al., 1996) (**figure 34**). Enfin, une étude récente démontre que le Tanshinone IIA (Tan IIA), une herbe issue de la médecine chinoise connue pour favoriser la surexpression des Cx26 et Cx43 dans des cellules B16 (mélanome de souris) augmente ainsi l'effet *bystander* du système thymidine kinase / ganciclovir grâce à une augmentation du couplage jonctionnel (Xiao et al., 2013).

Toutes ces études montrent que l'induction des connexines / jonctions communicantes dans un effet *bystander* peut potentialiser les effets d'une GDEPT

notamment lorsque que les métabolites toxiques ne peuvent pas diffuser passivement à travers les membranes. Cependant, de nombreuses études ont montré que dans la plupart des processus néoplasiques, l'expression des connexines étaient fortement diminuée et qu'elles se localisaient anormalement dans le cytoplasme des cellules (Pointis et al., 2007) (Cronier et al., 2009) diminuant ainsi le couplage jonctionnel entre les cellules tumorales.

PRÉSENTATION DU TRAVAIL

Le cyclophosphamide possède l'avantage d'avoir des métabolites diffusibles passivement d'une cellule à l'autre (Wei et al., 1995) (Chen and Waxman, 1995) (Gunther et al., 2006), contribuant ainsi à un effet *bystander* et entraînant la mort des cellules tumorales adjacentes (mécanisme 1). Comme il a été décrit précédemment, cet effet de proximité pourrait également utiliser les jonctions communicantes (mécanisme 2), comme avec des métabolites phosphorylés et en dépit d'une expression fortement diminuée dans un grand nombre de tumeurs (Cronier et al., 2009) (Pointis et al., 2007). C'est pourquoi, afin d'étudier l'effet *bystander* lors de la réponse thérapeutique du CPA, nous nous sommes proposés de savoir si ces deux mécanismes agissaient en synergie.

Dans un premier temps, nous avons regardé les effets des métabolites du CPA sur des cellules tumorales pulmonaires humaines (A549) en étudiant la stabilité du CPA et du 4-OH-CPA dans les milieux de cultures de cellules exprimant la protéine CYP2B6TM-RED, par spectrométrie de masse et les effets de ces milieux conditionnés sur des cellules A549 naïves ; le but étant l'étude de la diffusion passive.

Nous avons ensuite vérifié la présence de jonctions communicantes dans des biopsies de tumeurs pulmonaires humaines et dans une lignée tumorale pulmonaire humaine (A549) en étudiant les niveaux d'expression des ARNm de connexines majoritairement retrouvés dans le poumon sain (Cx26, Cx32, Cx43) par qRT-PCR. Puis nous avons examiné l'expression de la Cx43 par western blot et sa localisation tissulaire et cellulaire par immunofluorescence. Une technique de microscopie confocale, le Gap-FRAP (Gap pour « Gap junction » Fluorescence recovery after photobleaching) (Carette et al., 2009) a été utilisée pour étudier la fonctionnalité des jonctions communicantes entre les cellules A549.

Enfin, nous avons analysé l'effet cytotoxique du CPA *in vitro* en présence d'un inhibiteur spécifique des connexines : l'acide alpha-glycyrrhétinique (α -GA), par des tests MTS.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

ÉTUDE DE LA STABILITÉ DES MÉTABOLITES DU CPA ET DE LEUR DIFFUSION DANS LES CELLULES

Des cellules A549 exprimant la protéine CYP2B6TM-RED ont été incubées durant 48 heures avec du CPA (1 ou 3 mM), ou du 4-OOH-CPA (4-hydropéroxy-CPA) qui se transforme spontanément en 4-OH-CPA en solution. Après incubation, du milieu de culture est récupéré puis analysé par spectrométrie de masse au laboratoire de Biochimie de l'Hôpital Saint Louis (Dr Bernard Gourmel), pour déterminer les concentrations de CPA et de 4-OH-CPA. Parallèlement, pour étudier la diffusion des métabolites, la concentration en 4-OH-CPA dans le milieu de cellules A549 exprimant le CYP2B6TM-RED et traitées au CPA a été mesurée et la toxicité de ce milieu conditionné sur des cellules A549 naïves a été testée.

TEST DE FONCTIONNALITÉ DES JONCTIONS COMMUNICANTES (GAP-FRAP)

Des cellules A549 exprimant ou non le transgène CYP2B6TM-RED, traitées ou non au CPA (1,5 mM), ont été incubées en présence de calcéine – AM (Invitrogen) à une concentration de 5 μ M dans du milieu de culture pendant 30 minutes à 37°C°. La calcéine AM pénètre par diffusion passive dans les cellules puis par desestérification sous l'action d'estérases cytoplasmiques émet une fluorescence verte et ne diffuse plus à travers les

membranes cellulaires. Ces cellules « devenues » fluorescentes sont observées au microscope confocal (Zeiss LSM 510) et sont sélectionnées aléatoirement pour être individuellement photoblanchies avec un laser (488 nm). Après photoblanchiment, des images sont prises toutes les 3 minutes pendant 12 minutes. Le pourcentage de retour de fluorescence dans les cellules photoblanchies est analysé avec le logiciel ImageJ sur les images prises 12 minutes après le photoblanchiment. Le retour de fluorescence dans une cellule photoblanchie démontre que les jonctions communicantes sont fonctionnelles laissant passer la calcéine fluorescente, verte, des cellules avoisinantes (non photoblanchies). Cette expérience a été validée par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique des jonctions communicantes, l'acide alpha glycyrrhétinique (α -GA ou AGA) (75 μ M) (Carette et al., 2009).

IMMUNOFLUORESCENCE

Les coupes de biopsies des tumeurs pulmonaires sont obtenues après coupe à congélation, et les cellules (A549) ensemencées sur lamelles sont fixées au méthanol durant 6 minutes à -20°C. Les échantillons sont ensuite perméabilisés avec 0,1 % de triton X100 dans du PBS pendant 15 minutes à température ambiante. Après le blocage des antigènes non spécifiques avec de la BSA 3% dans du PBS pendant 30 minutes, les échantillons sont incubés avec les anticorps primaires : anti-Cx43 (souris, 1/100) et anti-ZO1 (lapin, 1/200) à 4°C pendant la nuit. Après plusieurs rinçages avec du PBS-BSA 3%, les échantillons sont ensuite incubés avec des anticorps secondaires couplés aux fluorochromes anti-FITC ou TRITC (respectivement anti-souris, anti-lapin produit chez la chèvre), deux heures à température ambiante. Les échantillons sont scellés à l'aide d'un milieu de montage contenant du DAPI.

Les échantillons sont observés avec un microscope à épifluorescence TE-2000E (Nikon) et des images sont collectées avec le logiciel NIS Element (Nikon) et déconvoluées avec le logiciel AutoQuant (Media Cybernetics).

PCR EXPRESSION CONNEXINES

Pour étudier les niveaux d'expression de connexines dans les biopsies et les cellules A549, les ARNm totaux ont été extraits à l'aide d'un kit RNeasy Qiagen. Les ARNm extraits sont rétro-transcrits à l'aide du kit High Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems).

Amorces utilisées :

Cx 43

F 5'-CTATCTTTGAGGTGGCCTTTC-3'

R 5'-TCGCTCTTTCCTTAACCCG-3'

Cx 32

F 5'-AAATGCTACGGCTTGAGGGC-3'

R 5'-CGGAACACCACGCTGATGAC-3'

Cx 26

F 5'-GCTGCAAGAACGTGTGCTAC-3'

R 5'-TGGGTTTTGATCTCCTCGAT-3'

	CPA ($\mu\text{mol/L}$)	4-OH-CPA ($\mu\text{mol/L}$)
Traitement 48 heures CPA 1 mM	649,35	2,08
Traitement 48 heures CPA 3 mM	1843,11	1,46
Traitement 48 heures de cellules naïves avec surnageant de cellules traitées au CPA 3 mM	1319,13	0,34
Traitement 48 heures 4-OOH-CPA 1 mM	-	0,24
Traitement 48 heures 4-OOH-CPA 2 mM	-	0,50
Traitement 48 heures 4-OOH-CPA 3 mM	-	1,64

Tableau 7 : Concentrations en CPA et 4-OH-CPA retrouvées dans des milieux de cultures après traitement de cellules A549 CYP2B6TM-RED avec du CPA ou du 4-OOH-CPA durant 48 heures

Les concentrations ont été mesurées par spectrométrie de masse (Hôpital Saint-Louis, Paris, Service de Biochimie, Dr Bernard Gourmel)

RESULTATS

ÉTUDE DE LA STABILITÉ DES MÉTABOLITES DU CPA ET DE LEURS EFFETS SUR LES CELLULES.

Les cellules A549 exprimant la protéine CYP2B6TM-RED traitées au CPA à 1 ou 3 mM produisent du 4-OH-CPA qui est observé 48 heures après le début du traitement, on retrouve également des concentrations importantes de CPA dans le milieu. Lorsque l'on ajoute du milieu de culture conditionné, provenant de cellules A549 CYP2B6TM-RED traitées 48 heures au CPA, sur des cellules A549 naïves (n'exprimant pas le CYP2B6TM-RED), on observe : d'une part que 96 heures après on retrouve du 4-OH-CPA dans les milieux de culture (**tableau 7**) et d'autre part on observe une mortalité cellulaire.

Dans les milieux de cultures des cellules traitées au 4-OOH-CPA (4-hydropéroxy-CPA), on ne retrouve pas de CPA, en revanche on retrouve du 4-OH-CPA.

Une mortalité cellulaire est également observée sur les cellules A549 traitées avec du 4-OOH-CPA. 48 heures après le début du traitement.

NIVEAUX D'EXPRESSION EN ARNm DES CONNEXINES 26, 32, 43, DANS UNE LIGNÉE TUMORALE ET DANS DES BIOPSIES DE TUMEURS PULMONAIRES HUMAINES.

Nous avons étudié les niveaux d'expression en ARNm des connexines 26, 32 et 43 majoritairement retrouvés dans le poumon sain (Kar et al., 2012) (**figure 35**), dans 20 biopsies humaines de tumeurs pulmonaires.

On observe dans un premier temps que les niveaux d'expression des ARNm des connexines 26, 32, 43 varient énormément d'une biopsie à une autre.

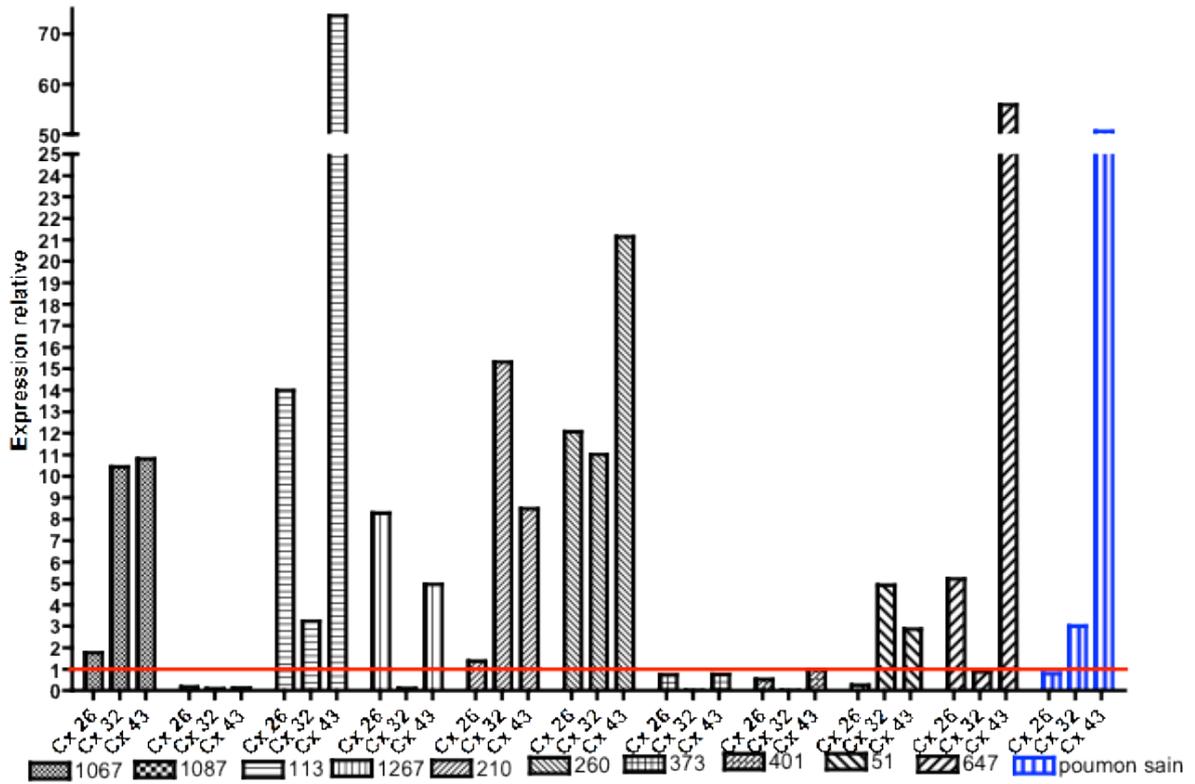


Figure 35 : Expression relative des connexines 26, 32, 43 dans des biopsies tumorales pulmonaires humaines

On peut voir que parmi les 3 principales connexines exprimées dans le poumon, la connexine 43 est la plus exprimée, aussi bien dans le tissu sain que dans les tissus tumoraux.

A la suite de ces résultats ; nous avons décidé de nous focaliser plus particulièrement à l'expression et la localisation protéique de la connexine 43 (Cx43)

EXPRESSION ET LOCALISATION DE LA CONNEXINE 43 DANS UNE LIGNÉE TUMORALE ET DES COUPES DE BIOPSIES TUMORALES PULMONAIRES HUMAINES.

A. L'expression de la connexine 43 a été mise en évidence par Western Blot dans les cellules A549, matérialisée par une bande à 43 kDa non visible dans les cellules HeLa n'exprimant pas de connexines endogènes (Mesnil et al., 1996) (**figure 36 A**). En comparant avec des cellules de Sertoli, SerW3, non tumorales qui expriment de manière endogène la Cx43 (Fiorini et al., 2008), on peut voir que l'expression de la Cx43 est diminuée dans les cellules tumorales de poumon A549.

B. Le marquage de la Cx43 par immunofluorescence sur les coupes de biopsies pulmonaires montre sa présence en formant quelques lignes membranaires entre les cellules, comme le montre la colocalisation avec ZO-1, protéine d'échafaudage sous-membranaire. Ces lignes sont caractéristiques des regroupements de canaux de connexines entre les membranes des cellules autrement appelées « plaques jonctionnelles », signe d'une communication intercellulaire. Le même type de marquage est retrouvé dans les cellules de la lignée A549, on observe quelques lignes membranaires qui colocalisent avec

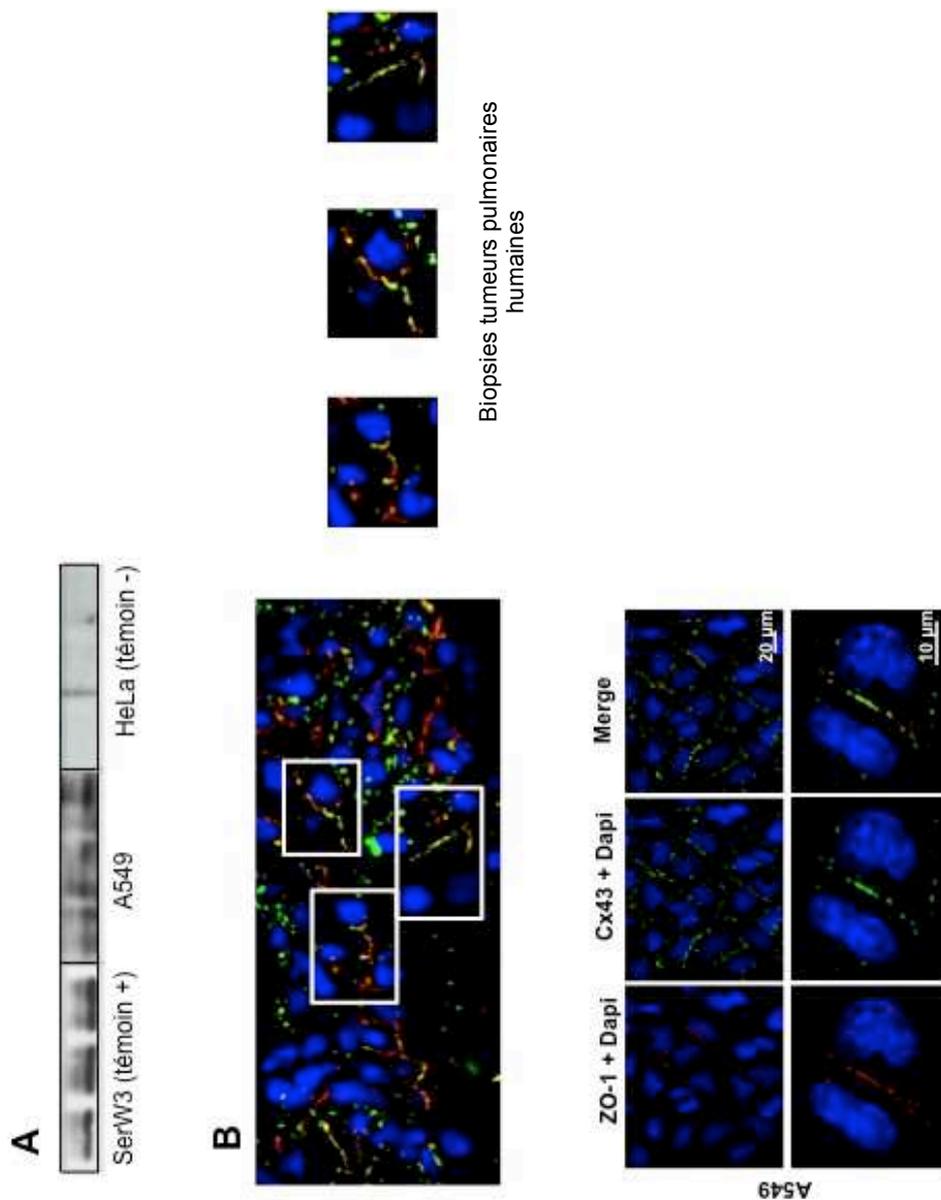


Figure 36 : Images d'immunofluorescence de lignées tumorale pulmonaire humaine A549 et d'une coupe de tumeur pulmonaire humaine

En bleu les cellules colorées par le DAPI. En rouge le marquage de la protéine ZO-1, en vert le marquage de la connexine 43

ZO-1, mais cette analyse *in vitro* nous montre également un signal diffus de la Cx43 dans le cytoplasme des cellules signe d'une perte du couplage jonctionnel sous forme de plaques jonctionnelles à la membrane (**figure 36 B**).

Ces résultats confirment qu'il y a bien une perturbation dans l'expression et une aberration dans la localisation intracellulaire des connexines dans les processus néoplasiques comme il a été observé dans la littérature (Pointis et al., 2007) (Cronier et al., 2009), cependant le peu de canaux restant à la membrane sont-ils fonctionnels et ainsi, contribueraient-ils à un effet *bystander* des métabolites cytotoxiques du CPA passant par les jonctions communicantes ?

TEST DE FONCTIONNALITÉ DES JONCTIONS COMMUNICANTES DANS DES CELLULES A549

Pour mettre en évidence la fonctionnalité du couplage jonctionnel dans les cellules A549, nous avons utilisé la technique du Gap-FRAP. Plusieurs conditions ont été testées : traitées ou non au CPA, en présence ou non d'inhibiteur des connexines...

On peut voir que dans toutes les conditions, les cellules photoblanchies (panel central) connaissent un retour de fluorescence qui se matérialise par un retour à une couleur verte claire au bout de 12 minutes, avec en moyenne un pourcentage de retour de 15 % contre 30% de retour dans les SerW3, cellules de Sertoli non tumorales (**figure 37 A**) (Fiorini et al., 2008). En présence de l'inhibiteur des connexines (α -GA), le retour est quasi nul, de l'ordre de 3-4 %.

Ces résultats montrent que bien que l'expression des connexines soit diminuée, le peu de plaques jonctionnelles présentes à la membrane des cellules A549 sont fonctionnelles.

Nous avons donc voulu savoir si le peu de jonctions communicantes fonctionnelles pouvait participer à l'effet cytotoxique du CPA.

ETUDE DE LA CYTOTOXICITÉ DU CYCLOPHOSPHAMIDE EN PRÉSENCE D'UN INHIBITEUR DES CONNEXINES

Nous avons traité des cellules A549 exprimant le gène de fusion CYP2B6TM-RED avec des concentrations croissantes de CPA durant 48 heures. Dans le cas contrôle, après 48 heures de traitement à 3 mM, nous retrouvons une bonne sensibilisation des cellules tumorales avec une mortalité cellulaire importante, d'environ 60 %. En présence d'inhibiteur des connexines (α -GA), on observe une moindre sensibilisation des cellules de l'ordre de 35 %.

Les résultats nous laissent penser qu'en plus d'un effet *bystander* par diffusion passive des métabolites, il pourrait y avoir un effet passant par les jonctions communicantes.

DISCUSSION

L'efficacité de la GDEPT repose en partie sur la présence d'un effet *bystander*. Ainsi, comme les résultats le montrent, les métabolites actifs du cyclophosphamide sont capables de diffuser à travers les membranes cellulaires. Ces effets toxiques produits par le 4-OH-CPA seul sur les cellules A549, et ceux produits par le milieu conditionné montrent qu'en plus de diffuser ils sont capables d'exercer leurs effets cytotoxiques relativement longtemps.

Nous avons vu que dans des tissus tumoraux l'expression des connexines était diminuée par rapport aux tissus sains (Pointis et al., 2007) (Cronier et al., 2009). Les mêmes résultats sont

observés à la fois sur des biopsies de tumeur pulmonaire mais aussi sur une lignée tumorale pulmonaire. Les images d'immunofluorescence permettent de confirmer qu'une partie des connexines exprimées ont une localisation cytoplasmique aberrante, avec pour conséquence la diminution du nombre de canaux fonctionnels ; quelques protéines sont correctement exprimées à la membrane formant des plaques jonctionnelles, assurant une fonctionnalité de ces dernières. On peut donc en conclure que bien qu'elles soient sous-exprimées et qu'une partie de l'expression de celles-ci soit ectopique, le peu de connexines à la membrane suffirait pour assurer une fonctionnalité minimale des jonctions communicantes.

L'effet *bystander* sera plus ou moins important suivant que les métabolites cytotoxiques sont diffusibles ou non. Ainsi, le cyclophosphamide et son métabolite actif, le 4 OH-CPA présente l'avantage de diffuser passivement à travers les membranes cellulaires (Wei et al., 1995) (Chen and Waxman, 1995) (Friedlos et al., 1998) (Gunther et al., 2006) et donc de passer d'une cellule à une autre de proche en proche jouant ainsi un rôle dans l'efficacité thérapeutique de notre système de GDEPT. D'autant plus, que nos expériences de spectrométrie de masse ont montré que le métabolite actif du CPA le 4-OH-CPA est relativement stable dans le milieu de culture des cellules A549 et renforcent ainsi l'idée que l'effet *bystander* impliquant la diffusion passive est utilisé par le 4-OH-CPA dans notre système.

Cependant, en plus de la diffusion passive utilisée par le 4-OH-CPA, il était intéressant d'étudier l'implication des jonctions communicantes dans notre étude pour renforcer et amplifier l'effet *bystander* et donc l'efficacité thérapeutique de notre GDEPT. En effet, dans la combinaison thymidine kinase / ganciclovir, des études ont démontré que le métabolite actif du ganciclovir passait exclusivement par les jonctions communicantes du

fait de son état physicochimique (phosphorylé) ne lui permettant pas de diffuser passivement à travers les membranes cellulaires (Pitts, 1994) (Mesnil et al., 1996) (Elshami et al., 1996) (Fick et al., 1995) (Mesnil, 2004). Ainsi, le 4-OH-CPA, d'un point de vue physicochimique, n'a pas de problèmes pour diffuser passivement à travers les membranes cellulaires (Wei et al., 1995) (Chen and Waxman, 1995) (Friedlos et al., 1998) (Gunther et al., 2006) mais peut également traverser les cellules grâce à la communication intercellulaire établie par les jonctions communicantes. Cette communication intercellulaire, existe bien dans les cellules A549 comme nous l'avons démontré avec la présence de la Cx43 dans nos expériences de Western Blot, d'immunofluorescence et qu'il existe bien un couplage jonctionnel (Gap-FRAP). Cependant, ces expériences nous ont confirmé également que l'expression de la Cx43 était diminuée et qu'elle se localisait anormalement dans le cytoplasme diminuant ainsi le couplage jonctionnel entre les cellules A549 (15% de retour de fluorescence contre 30% pour les cellules SerW3, cellule de Sertoli non tumorale (Fiorini et al., 2008) qui expriment fortement les connexines) comme il a pu être amplement décrit dans la littérature (Pointis et al., 2007) (Cronier et al., 2009)

Ainsi, ces données ne sont pas suffisantes pour nous permettre de penser que l'effet *bystander* du 4-OH-CPA, qui a la capacité de diffuser passivement à travers les membranes, utilisent également les jonctions communicantes pour traverser les cellules. En effet, nos expériences ne montrent pas que le 4-OH-CPA passe à travers les jonctions communicantes établis entre les cellules A549 et donc de l'affirmer avec certitude. En effet, les canaux de connexines laissent passer une grande variété de molécules d'une taille inférieure à 1 kDa (Goodenough and Paul, 2009), mais possèdent des perméabilités différentes en fonction du type de connexines mises en jeu avec la formation de canaux homotypiques et canaux hétérotypiques (Koval, 2006) (Goodenough and Paul, 2009) (Carette et al., 2009). De plus, d'autres molécules peuvent passer à travers les jonctions communicantes

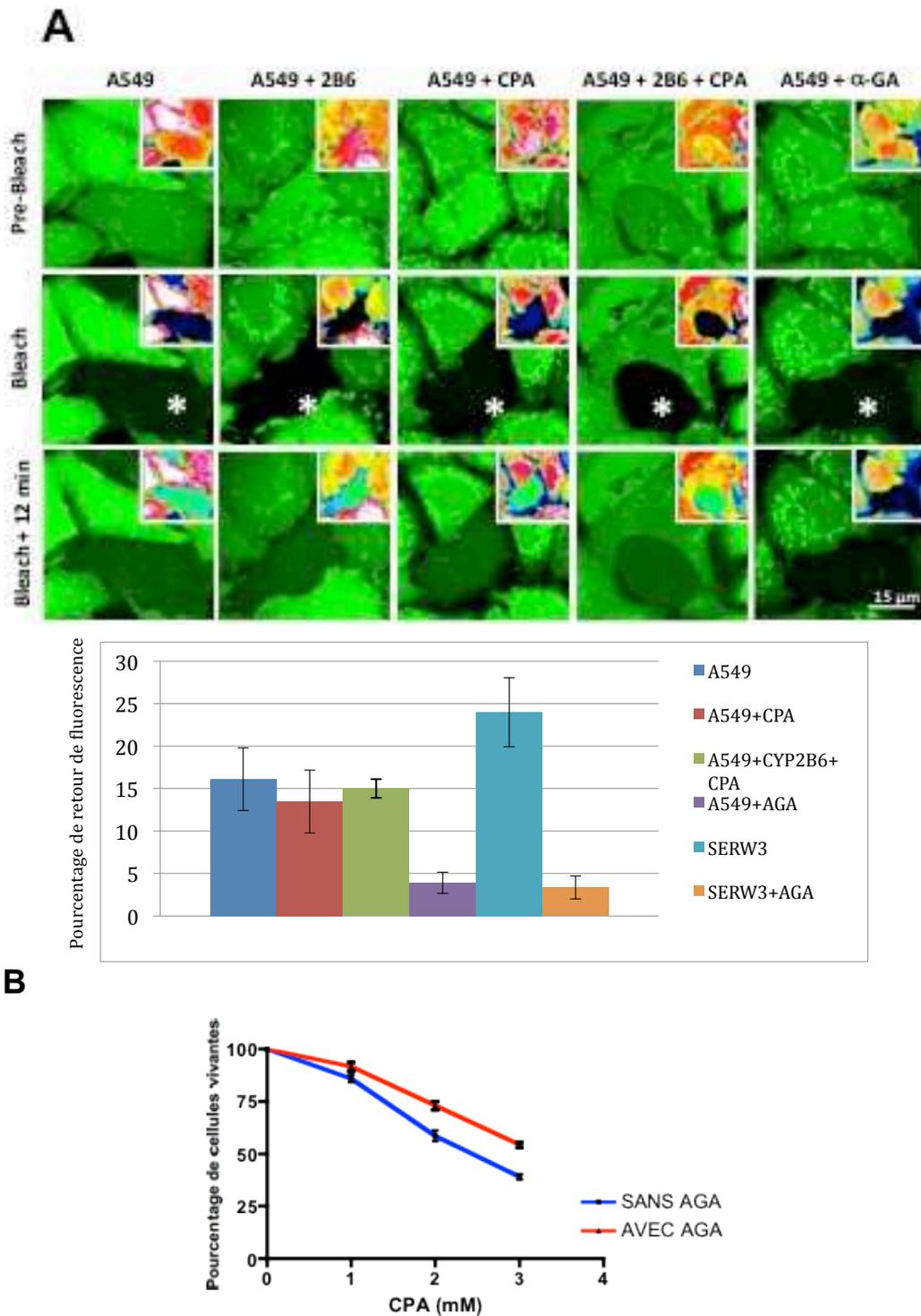


Figure 37 : Résultats Gap-FRAP et Mortalité cellulaire après traitement au CPA de cellules A549 CYP2B6TM-RED en présence ou non d' α -GA (inhibiteur de connexines)

A) Images de microscopie confocale avant et après photoblanchiment de cellules A549 fluorescentes. Les cellules ont été mises ou non au contact de CPA ou d'inhibiteur des connexines l' α -GA. En haut à droite de chaque image, la fluorescence a été reconstituée à l'aide de fausses couleurs (plus les couleurs sont chaudes plus la fluorescence est importante). Les cellules photoblanchies sont indiquées par une étoile. Pourcentage de retour de fluorescence après photoblanchiment en fonction de différentes conditions (cellules exprimant ou non le CYP2B6TM-RED, exposée au CPA ou non, à l' α -GA ou non)

B) En bleu, les cellules ne sont pas en contact avec l' α -GA, en rouge les cellules sont incubées pendant une heure en présence d'AGA. La viabilité cellulaire a été mesurée à l'aide d'un test MTS.

et exercer des effets pro ou anti apoptotiques (Kameritsch et al., 2013) jouant un rôle dans l'amplification des signaux de mort dans les cellules tumorales mais ne serait pas due « directement » au passage des métabolites cytotoxiques à travers les jonctions communicantes. Enfin certaines études ont montré que lorsque l'on utilisait des inducteurs du couplage jonctionnel et/ou d'expression des connexines, comme l'AMPc, les rétinoïdes et les caroténoïdes, cela permet d'amplifier l'efficacité de la GDEPT (Kandouz and Batist, 2010) (Xiao, 2013 #496). Ainsi, Ces données suggèrent potentiellement un cumul de fonction des connexines dans leur effet *bystander* en GDEPT.

Pour vérifier que le 4-OH-CPA passe à travers les jonctions communicantes établies entre les cellules A549, il serait intéressant d'envisager un procédé qui rendrait le métabolite actif, 4-OH-CPA, fluorescent et qui serait alors visible et pourrait être suivi dans des cellules vivantes par vidéomicroscopie à fluorescence. Des modèles de reconstruction des membranes artificielles pourraient permettre d'étudier le passage des métabolites à travers celles-ci. Malheureusement, ces modèles ne peuvent être établis que sur des modèles *in vitro* et pas *in vivo*. Nous ne disposons à l'heure actuelle d'aucun outil d'imagerie suffisamment puissant permettant de descendre au niveau cellulaire *in vivo*. La part de chaque mécanisme impliqué dans l'effet *bystander* *in vivo* restera une hypothèse jusqu'au jour où nous disposerons d'outils puissants d'imagerie.

En conclusion, toutes ces expériences effectuées *in vitro*, montrent que :

- 1) en présence d'inhibiteur de connexines (AGA), on retrouve une légère diminution de la sensibilisation au CPA (**figure 37**) et que la diffusion passive est potentiellement le mécanisme essentiel dans l'effet *bystander* du CPA.
- 2) Ces expériences ne suffisent pas pour démontrer que l'effet cytotoxique du métabolite actif du CPA observé dans notre système GDEPT soit exercé *in vivo*

uniquement par la diffusion passive et potentiellement par la présence de quelques jonctions communicantes.

- 3) En particulier, des phénomènes de type *bystander* « à distance » mentionnés dans la littérature tels que des effets immunitaires antitumoraux, des actions dans le microenvironnement tumoral... sont autant d'autres mécanismes pouvant jouer un rôle synergique avec la diffusion passive, la diffusion via les jonction communicantes dans l'effet *bystander* observé dans la GDEPT.

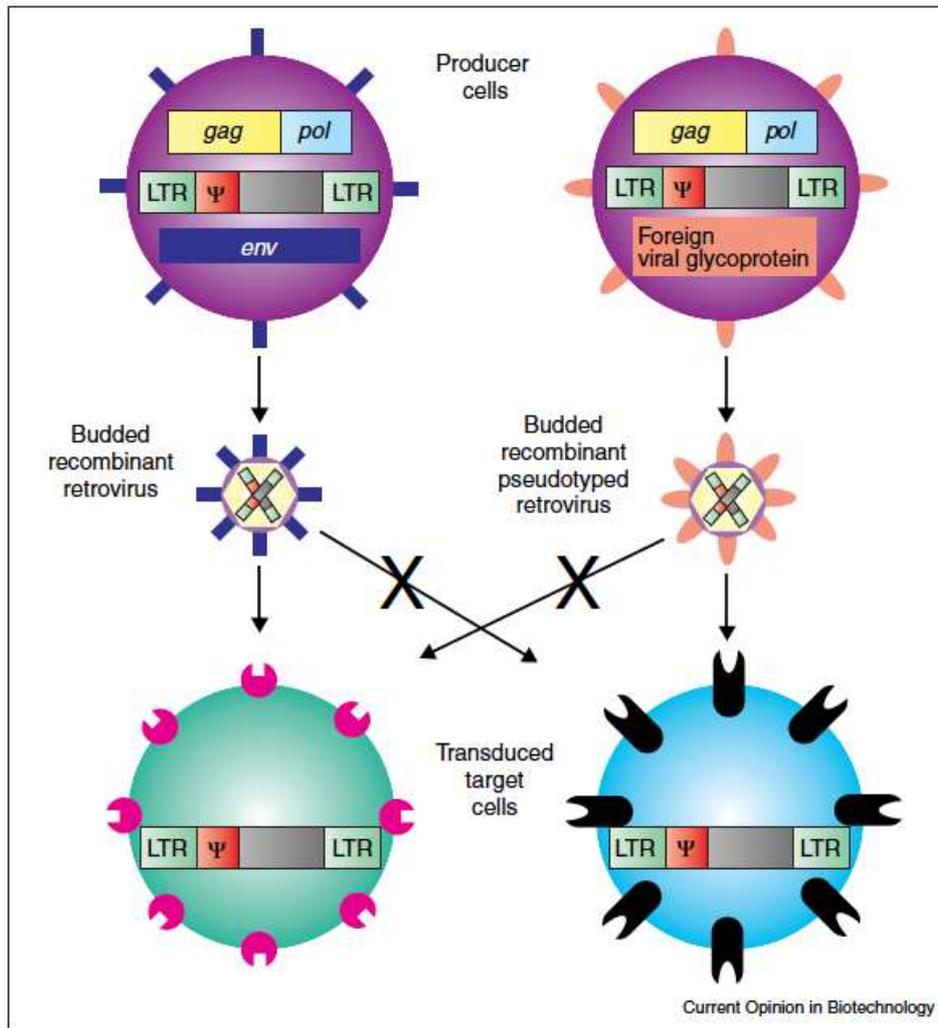


Figure 38 : Représentation schématique de la production de vecteurs pseudotypés et l'interaction avec leurs cibles
(D'après Sander et al., 2002)

La production des vecteurs viraux implique l'utilisation de 3 plasmides.

Les virus avec les protéines Env à la surface peuvent infecter la cellule verte avec les récepteurs magenta, mais pas la cellule bleue. Les virus pseudotypés possèdent un tropisme altéré et peuvent infecter que la cellule bleue avec les récepteurs noirs, mais pas la cellule verte.

ANNEXE IV : CIBLAGE DES CELLULES

Une des limitations à la thérapie génique, c'est le manque d'efficacité du système de transfert et le manque de spécificité pour sa cible. Ces manques sont à l'origine de résultats moyens voire très décevants lorsqu'une application de thérapie génique passe du stade préclinique au stade clinique. Pour palier à cela, des systèmes ont été mis au point afin de permettre de cibler de manière plus spécifique les cellules tumorales. Il s'agit principalement d'agir au niveau du vecteur de transfert qu'il soit viral ou non, en modifiant son tropisme. Pour cela des récepteurs tumoraux spécifiques pourraient constituer de bonnes cibles pour l'interaction avec le vecteur. Par exemple, des glycoprotéines de membrane de l'enveloppe virale, pour un vecteur viral, pourront être spécifiques d'un récepteur cellulaire (**figure 38**). Des anticorps peuvent également être greffés à la membrane du vecteur pour interagir selon une réaction anticorps – antigène pour transférer l'information génétique dans la cellule cible uniquement.

L'action pourra également être menée au niveau transcriptionnel, en permettant une expression tissu spécifique. Pour cela un promoteur peut être utilisé en amont de la séquence du transgène assurant une expression dans le seul tissu où le promoteur peut être induit. Ce promoteur utilisé étant spécifique d'un tissu tumoral, l'expression du transgène sera alors réduite à sa cible. On parlera ici de ciblage transcriptionnel. D'autres techniques consistent à empêcher la transcription de l'ARNm du transgène dans les tissus sains avoisinant la tumeur par l'utilisation des miRNA exprimés dans les tissus. Pour cela, des séquences cibles de miRNA, exprimés dans les tissus sains et non exprimés dans les tumeurs, sont introduites dans la séquence non codante du transgène. L'ajout de ces séquences permettra l'expression du transgène dans les tumeurs mais empêchera son expression dans les tissus sains avoisinants.

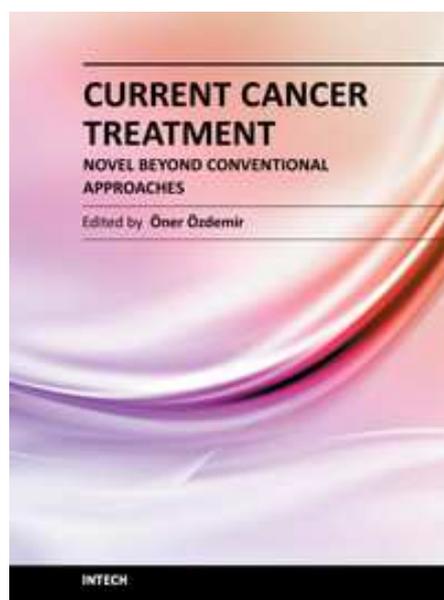
Une revue des techniques actuellement mises au point pour améliorer le ciblage des vecteurs a été rédigée dans un chapitre intitulé *Cancer gene therapy : the new targetting challenge*, publié dans le livre *Current Cancer Treatment – Novel beyond conventional approaches*.

CHAPITRE PUBLIÉ DANS *CURRENT CANCER TREATMENT – NOVEL BEYOND CONVENTIONAL APPROACHES*.

CANCER GENE THERAPY: THE NEW TARGETING CHALLENGE

Walid Touati, Philippe Beaune and Isabelle de Waziers (2011). ISBN: 978-953-307-397-2, InTech, DOI: 10.5772/24788.

<http://www.intechopen.com/books/current-cancer-treatment-novel-beyond-conventional-approaches/cancer-gene-therapy-the-new-targeting-challenge>



Cancer Gene Therapy: The New Targeting Challenge

Walid Touati, Philippe Beaune and Isabelle de Waziers
*UMR-S 775 Université Paris Descartes INSERM
France*

1. Introduction

Cancer is characterized by genetic alterations due, for instance, to mutations in genomic DNA caused by chemicals (mutagens such as pollutants or nitrosamines, and polycyclic aromatic hydrocarbons), radiations (e.g., prolonged exposure to ultraviolet radiation from the sun, which can lead to melanoma or other skin malignancies), and viral infections (e.g., papilloma virus; human T-cell leukemia viruses 1, 2, 3, and 4; and herpes simplex virus). Mutations in genes involved in cell proliferation, tumor suppressor genes, or proto-oncogenes may lead to uncontrolled cell proliferation into a tumor. Currently, the most widely used treatments for cancer are combinations of surgery, radiotherapy and chemotherapy. However, the effectiveness of these treatments is variable. Consequently, means of potentiating conventional treatments, as well as new strategies, need to be developed.

Gene therapy is generally perceived as a treatment for rare genetic diseases, in which replacing the deficient gene by its normal counterpart has proved successful, most notably in severe combined immunodeficiency (SCID) (Fischer et al., 2010), adrenoleukodystrophy (Cartier et al., 2009), and β -thalassemia (Cavazzana-Calvo et al., 2010). However, cancer is the main focus of basic and clinical research on gene therapy (<http://www.wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical/>). Variable levels of success have been achieved using a broad range of genes encoding tumor suppressor proteins such as p53, antiangiogenic proteins such as anti-vascular endothelial growth factor (VEGF), inflammatory cytokines, and other proteins (Lane et al., 2010), (Candolfi et al., 2010), (Adachi et al., 2010).

One of the main hurdles in gene therapy is selective delivery of recombinant vectors to the target tissue. In cancer gene therapy, administration of the vector within the tumor may be of interest, but some tumors are not readily accessible and vector dissemination to healthy cells cannot be ruled out. Today, accurate tumor targeting is a major goal of cancer gene therapy.

In this chapter, we will focus on the methods developed to improve targeting in cancer gene therapy, most notably gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT), which is a major focus of research at our laboratory.

2. Gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT)

Cytotoxic chemotherapy is often associated with severe systemic toxicities. Gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT) or suicide gene therapy consists in selective delivery to

the tumor of a gene encoding a drug-metabolizing enzyme that catalyzes the *in situ* conversion of a non-toxic prodrug to a toxic active drug (Figure 1). GDEPT can be used to increase the levels of an enzyme produced by the tumor or to introduce an enzyme that is not expressed endogenously. The local production of the cytotoxic drug within the tumor is expected to result in greater effectiveness and less toxicity, compared to systemic drug delivery.

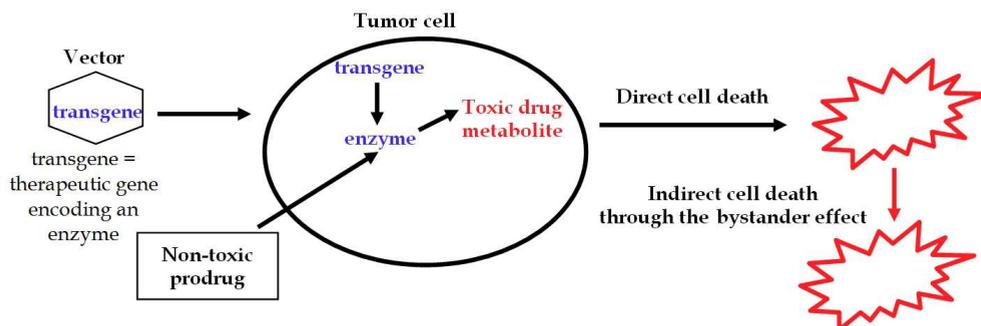


Fig. 1. Principle of gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT)

Several studies have been performed with different enzyme and prodrug combinations. The most widely studied combinations are herpes simplex thymidine kinase/ganciclovir, cytosine deaminase/5-fluorouracil, and cytochrome P450 (CYP)/oxazaphosphorines (cyclophosphamide [CPA] and ifosfamide) (Altaner, 2008) (Table 1)

Enzymes	Source	Prodrug	Drug	Indication
Herpes simplex thymidine kinase	Herpes simplex virus	Ganciclovir	Ganciclovir triphosphate (GCV-TP)	Glioma, pancreatic cancer
Cytosine deaminase	<i>Escherichia coli</i>	5-Fluorocytosine (5-FC)	5-Fluorouracil (5-FU)	Glioblastoma, Colorectal cancer
Cytochrome P450	Rat/human/dog	Cyclophosphamide (CPA)	4-OH Cyclophosphamide (4-OH CPA)	Head and neck cancer, lung cancer, Burkitt's lymphoma
Nitroreductase	<i>Escherichia Coli</i>	CB1954	N-acetoxy derivatives	Cancer cells in general

Table 1. Enzyme/prodrug combinations used in GDEPT

2.1 Cytochrome P450 (CYP)/cyclophosphamide (CPA) combination

The chemotherapeutic prodrug CPA is widely used for the treatment of both solid tumors and hematological malignancies. Enzymatic bioactivation, chiefly via human CYP2B6 (Gervot et al., 1999), produces the metabolite 4'-OH-CPA, which undergoes spontaneous decomposition to acrolein and phosphoramidate mustard. Phosphoramidate mustard is an

electrophilic alkylating agent that causes the formation of intra- and interstrand DNA cross-links, which eventually lead to apoptotic cell death (Schwartz & Waxman, 2001). In patients treated with CPA, this prodrug is activated by CYP2B6 in the liver, and the active metabolites enter the bloodstream, which transports them not only to the tumor but also to healthy tissues where they may cause severe side effects including cardiotoxicity, renal toxicity, bone marrow suppression, and neurotoxicity (Fraiser et al., 1991) (Langford, 1997). To prevent these side effects, CYP2B-based gene-directed enzyme prodrug therapy was developed by D.J. Waxman and colleagues and, more recently, by our group (Waxman et al., 1999), (Jounaidi, 2002), (Jounaidi et al., 2006), (Tychopoulos et al., 2005). CYP2B expressed in tumor cells results in the *in situ* conversion of CPA to cytotoxic metabolites. Moreover, the diffusible 4'-OH-CPA metabolite can enter neighboring cells, where it is converted to phosphoramidate mustard, leading to the death of nontransfected tumor cells (Wei et al., 1995), (Tychopoulos et al., 2005). This bystander effect plays a major role in the CYP2B-based GDEPT strategy, and several studies of various suicide gene and prodrug combinations have shown that complete eradication of the tumor is possible even when the suicide gene product is expressed by less than 10% of the cells (Portsmouth et al., 2007)

In our laboratory, we are developing a GDEPT strategy based on human CYP2B6, the human CYP isoform that preferentially metabolizes CPA (Gervot et al., 1999). One of the main difficulties is the relatively low affinity of CYP2B6 for CPA. Modifications aimed at increasing the efficiency of CYP2B6 (V_{\max}/K_m) in catalyzing the 4-hydroxylation of CPA have therefore been evaluated. We used site-directed mutagenesis of the active site of CYP2B6 to produce a double mutant (I114V/V477W) characterized by a 4-fold increase in CPA-4-hydroxylation efficiency compared to the wild-type CYP2B6 (CYP2B6wt), ascribable chiefly to an increase in enzyme affinity (Nguyen et al., 2008). Recently, we obtained a triple CYP2B6 mutant (CYP2B6TM) that is 8 times more efficient than CYP2B6wt (unpublished results from our laboratory)

Another means of improving the efficiency of CYP2B6-mediated GDEPT is co-expression in the tumor cells of NADPH-cytochrome P450 reductase (RED). RED is a FAD- and FMN-containing enzyme that catalyzes the transfer from NADPH of electrons required for CYP-dependent enzyme reactions. Within tumors, where RED expression is heterogeneous (Fitzsimmons et al., 1996; L. J. Yu et al., 2001), CYP-GDEPT results in high levels of CYP expression, and RED availability can limit the rate of CYP-catalyzed enzyme reactions and, therefore, of prodrug bioactivation. To ensure the production of both CYP2B6 and RED by the same cancer cell, a CYP2B6wt-RED fusion protein having both 4-hydroxylase activity and reductase activity was built. This fusion protein proved more efficient than CYP2B6wt alone for metabolizing CPA in several pulmonary cell lines (Tychopoulos et al., 2005). Recently, we produced a CYP2B6TM-RED fusion protein that is 10 times more efficient than CYP2B6wt-RED in activating CPA (unpublished results from our laboratory).

These studies show that improving the efficiency of CYP2B6 is feasible. This method may allow the use of lower CPA dosages with no loss of cytotoxic effectiveness within the tumor but with less activation by hepatic CYP2B6 and, therefore, a possible decrease in cytotoxic effects on non-tumor tissue. Preliminary results in various human pulmonary and head-and-neck cancer cell lines show that expression of the CYP2B6TM-RED protein sensitized the cancer cells to lower doses of CPA compared to expression of CYP2B6wt-RED (unpublished results from our laboratory).

3. Gene therapy vectors

The most important step in any gene therapy protocol is the development of efficient vectors for delivering the transgene to its target. The ideal vector should be administered by a non-invasive route, penetrate only into the targeted cells in order to limit adverse side effects, and express the transgene in amounts sufficient to produce strong therapeutic effects. A wide range of vectors have been developed including viral vectors, polymers, liposomes, nanoparticles, and bare DNA.

Today, about 70% of clinical gene therapy trials worldwide use viral vectors such as retroviruses, adenoviruses, and adeno-associated viruses (AAV) or lentiviruses (Table 2) to transfer transgenes and 64.5% of these trials are conducted in patients with cancer (<http://www.wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical/>).

However, retroviral vectors used to treat SCID have been responsible for leukemia caused by transgene insertion into proto-oncogene regions (Hacein-Bey-Abina et al., 2003). This side effect has severely slowed the development of gene therapy. However, we now have safer vectors such as the lentivirus used for gene therapy of adrenoleukodystrophy (Cartier et al., 2009) and β -thalassemia (Cavazzana-Calvo et al., 2010). Transgenes from recombinant lentivirus may be integrated mainly within intragenic or intronic regions (S. H. Yang et al., 2008).

Here, we will focus on three viruses that are presently widely used in gene therapy, namely, adenoviruses, AAVs, and lentiviruses.

3.1 Adenoviruses

Adenoviruses cause mild upper airway diseases. They are non-enveloped icosahedral viruses composed of a nucleocapsid and double-stranded linear DNA genome of about 35 kb with inverted terminal repeat (ITR) sequences at each end. There are 51 classified human adenovirus serotypes; serotypes 2 and 5 are those used most widely in *ex vivo* and *in vivo* gene therapy. They are very convenient vectors, because they can accommodate relatively large segments of DNA, up to 8 kb. Moreover, their transduction efficiency is high. To avoid a strong immune response after vector delivery, non-replicative recombinant adenoviruses lacking some of the early genes involved in the immune response are used. Deletion of the E1 sequence renders the virus unable to produce infectious viral particles in infected cells, and the E3 region is not necessary for viral production since it encodes proteins involved in evading host immunity. Thus, deletion of E1 and E3 is used to decrease the host immune response to the viral proteins (Alba et al., 2005).

Adenoviral vectors allow episomal and, therefore, transient transgene expression by infected cells (no integration of the foreign DNA into the genome of the host cell) (Russell, 2009) (Alemany & Curiel, 2001).

To infect cells, adenoviruses use the coxsackie-adenovirus receptor (CAR) and integrins as primary cell surface attachment components (Figure 2). The adenovirus (Ad) fiber knob binds with high-affinity to the CAR receptor and the viral penton base interacts with integrins (Bergelson, 1999). CAR plays a significant role in liver transduction and, consequently, most of the adenoviral particles administered intravenously are sequestered in the liver (Vrancken Peeters et al., 1996). However, the mechanism of adenoviral infection *in vivo* is controversial, especially as the introduction of mutations that abrogate CAR binding does not significantly impact the infectivity of adenoviral vectors.

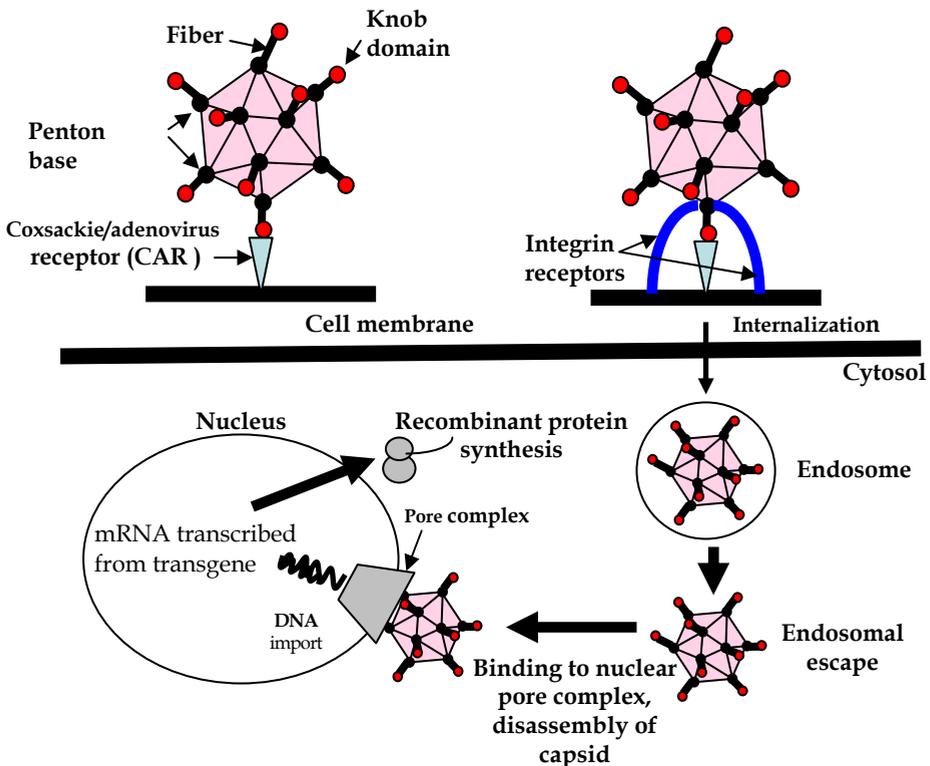


Fig. 2. Schematic representation of adenoviral attachment and internalization

Although immune responses have been limited, they have sometimes restricted the efficiency of adenoviral vectors in clinical trials. Increased immunogenicity has been reported, and many patients have pre-existing immunity to the adenoviral serotypes used in gene therapy. Cell-mediated recognition of the viral capsid components or nucleic acids has received considerable attention and is thought to be chiefly regulated by toll-like receptors (TLRs). Innate immune responses to viruses are initiated by the infected cells, which activate the interferon response to block viral replication, while simultaneously releasing chemokines that attract neutrophils, mononuclear cells, and natural killer cells. In 2010, adenoviruses were still the most widely used vectors for gene therapy. Nevertheless, the use of adenoviral vectors relative to other vectors decreases year on year.

3.2 Adeno-associated viruses (AAV)

Adeno-associated viruses (AAV) are small non-enveloped DNA viruses belonging to the parvovirus family. The single-strand DNA genome of about 4.8 kb comprises two open reading frames (*rep* and *cap*) flanked by inverted terminal repeats (ITRs). Twelve serotypes have been isolated from primate or human tissues (Schmidt et al., 2008). Advantages of AAVs include an apparent lack of pathogenicity, an ability to infect both non-dividing and dividing cells, and stable integration into the host genome at a specific site of the human

chromosome 19 when the vector includes the *rep* gene. In the absence of the *rep* gene, chromosomal integration occurs infrequently and at random sites (Huser et al., 2010).

The AAV infection cycle is initiated by the binding of the viral capsid to cell surface receptors. One of the main receptors involved is heparan sulfate proteoglycan (HSPG); moreover, several co-receptors contribute to transduction (Asokan et al., 2006). Receptor binding mediates endocytosis, endosomal escape and, finally, transport to the nucleus.

AAV vectors are constructed by replacing the viral DNA with an expression cassette encoding the gene of interest under transcriptional control of a suitable promoter. Vector production is achieved by transfection of a cell line with three plasmids: one contains the expression cassette flanked by the ITRs; another contains *rep cap* helper sequences, and the third is an adenoviral helper plasmid encoding the adenoviral E2a, E4, and VA helper genes (Grimm & Kleinschmidt, 1999).

AAVs have become very popular as gene therapy vectors because of both their ability to mediate stable and efficient gene expression and their good safety profile. The major drawbacks of AAVs are the small amount of DNA that the virus can carry, which results in low capacity; and the difficulty of producing the vector in high titers (Michelfelder & Trepel, 2009). AAVs have been used in at least 80 clinical trials (as of 2011), in strategies based on the delivery of cytotoxic genes, tumor suppressor genes, and other types of genes.

3.3 Lentiviruses

Lentiviruses are retroviruses that include the human immunodeficiency virus 1 (HIV-1). They have a lipid envelope and two identical single-stranded genomic RNA molecules that require a reverse transcriptase for conversion to DNA. The HIV genome is composed of two

	Adenovirus	Adenovirus-associated virus	Retrovirus	Lentivirus
Genome integration	Rarely	No (in absence of <i>rep</i> gene) Yes (in presence of <i>rep</i> gene)	Yes	Yes
Transgene expression	Transient	Stable	Stable	Stable
Immune response	Marked	According to conditions (animal, transgene, injection conditions,...)	Absent to moderate	Absent to moderate
Target cells	Quiescent or dividing	Quiescent or dividing	Dividing	Quiescent or dividing
Transgene size	up to 8 kb	limited	8-9 kb	8-9 kb
Main use in gene therapy	<i>in vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>ex vivo - in vivo</i>	<i>ex vivo</i>
Titer	>10 ¹¹	>10 ¹¹	>10 ⁸	>10 ⁸
Genotoxicity	No	No	Mutagenesis-related risks	No

Table 2. Characteristics of four viral vectors: adenovirus, adenovirus-associated virus, retrovirus, lentivirus.

regulatory genes, *tat* and *rev*, which are necessary for viral replication; and four accessory genes, *vif*, *vpr*, *vpu*, and *nef*, which are not required for *in vitro* replication or growth but are crucial for *in vivo* replication. The *tat* and *rev* proteins are involved in regulating HIV gene expression at the transcriptional and post-transcriptional levels, respectively (Pauwels et al., 2009).

Lentiviral particle production involves co-transfection by calcium phosphate precipitation of gag-pol, env, and vector plasmids into HEK 293T cells. Viral particles are then recovered from the cell medium, concentrated, and filtered. Finally, the viral titer is determined (Dull et al., 1998) (Kutner et al., 2009). The transgene present in recombinant lentiviruses is integrated into the host genome via an integrase and is therefore expressed in a stable manner over time. Among retroviruses, lentiviruses efficiently infect both dividing and non-dividing cells (Naldini et al., 1996) without inducing genotoxicity with insertional mutagenesis (Montini et al., 2009), since they are integrated mainly within intragenic or intronic regions. Lentiviruses (e.g., the HIV) use cell receptors such as CD4 and the co-receptors CCR5 or CXCR4 to penetrate the cells. Lentiviral vectors express various types of proteins that are recognized by cell receptors and co-receptors, leading to a very broad tropism.

Since these vectors were first introduced, they have been modified in several ways with the goal of improving their safety profile. Now, these viral vectors are being increasingly used. However, their lack of tissue specificity may limit their use, and several methods have been developed to improve their ability to target the desired site.

4. Current strategies for viral vector targeting

Today, the major goal in cancer gene therapy is to improve tumor targeting, thus preventing transgene expression by normal cells and therefore diminishing the risk of toxic side effects. Initially, the vector was injected directly into the tumor. However, vectors are now available that target the tumor after being administered systemically.

Efforts to improve viral vector targeting can modify the binding of the virus to the cell and entry of the virus into the cell (entry targeting/transductional regulation) or the events that occur once the virus is in the cell (post-entry targeting/transcriptional regulation). Several approaches have been devised such as envelope or capsid modifications, the use of various adapters, placement of transgene expression under specific promoter control, and modifications of the transgene sequence.

4.1 Pseudotyping: Envelope or capsid modification

Viral vectors infect their natural host-cell populations preferentially and with the greatest efficiency. Viral infection occurs when host-cell receptors recognize the viral envelope proteins. Pseudotyping consists in changing the plasmid encoding the expression of envelope proteins. The result is a shift in the range of host cells and, consequently, in the tissue tropism of the viral vector. The vector surface is modified via the incorporation of foreign envelope glycoproteins that have a restricted natural population of host-cell receptors (Frecha et al., 2008). This technique was the first to be used for modifying viral tropism, particularly in retroviruses such as lentiviruses, which have an envelope. Adenoviral vectors have no envelope, and the viral attachment protein must therefore be incorporated into a protein capsid instead of a lipid bilayer.

Lentiviral vector pseudotyping is usually achieved using the vesicular stomatitis virus G (VSV-G) protein, which exhibits a broad tropism for various cell types. Additional advantages of VSV-G-pseudotyped lentivirus are the higher viral titers compared to those obtained with other envelope proteins and the improved vector particle purification due to increased stability of the virus. However, when used in high concentrations, lentiviral vectors bearing VSV-G may exert cytotoxic effects (Chen et al., 1996). Fortunately, this drawback can be overcome either by improving purification of the lentiviral particles using gradient centrifugation to eliminate unincorporated transgene particles (Ricks et al., 2008) or by using other proteins for pseudotyping. VSV-G-pseudotyped particles are convenient to use *ex vivo* to express a transgene in a broad spectrum of cell lines. However, VSV-G-pseudotyped viruses can be inactivated by human serum (DePolo et al., 2000). In clinical trials of cancer gene therapy, the objective is to limit the tropism of the vector to the cancer cells.

Miletic et al., worked on a gene therapy strategy for malignant gliomas, which are the most common primary brain tumors and carry a poor prognosis due to their infiltrative growth (Miletic et al., 2004). Miletic and co-workers compared the expression of various pseudotyped lentiviruses in normal brain cells and malignant glioma cells. VSV-G pseudotyped lentiviruses infected the neurons and astrocytes, whereas the tropism of lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein (LCMV-GP) pseudotypes was virtually confined to the astrocytes. LCMV-G-pseudotyped lentivirus was specifically and efficiently transduced in rat gliomas, whereas VSV-G-pseudotyped lentivirus was considerably less efficient in transducing glioma cells.

Another protein often used to target cancer cells is the modified sindbis virus envelope. Pariente et al., (2007) used it successfully to target prostate cancer cells.

Transduction efficiency is low after tumor cell infection with adenoviruses. One reason is the limited expression of the coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR) in tumor cells. To overcome this obstacle, the adenovirus fiber can be modified by removing interactions with both CAR and integrins, the main components involved in adenovirus transduction (Einfeld et al., 2001). This modification diminishes the native tropism and enhances the efficacy of specific targeting ligands in redirecting the adenovirus to the target tissues.

Malignant gliomas are refractory to adenovirus-mediated gene therapy, chiefly because CAR is not expressed by the tumor cells. Zheng et al. identified several receptors that were over-expressed in tumor cells, and they created a series of pseudotyped adenoviral vectors. Some of these vectors enhance gene transfer to tumors and warrant further development for glioma gene therapy. (Zheng et al., 2007)

Yu et al., (L. Yu et al., 2005) reported increased infection of esophageal and oral carcinoma cells with adenoviruses whose Ad5 fiber was substituted with fibers from Ad11 or Ad35, compared to unmodified adenoviruses. Similarly, attaching the Ad3 fiber to the Ad5 backbone was particularly effective for targeting ovarian cancer and squamous cell carcinoma of the head and neck.

The efficacy of pseudotyping may be limited by the lack of tissue specificity and ubiquitous expression of some of the receptors. Furthermore, the viral envelope modifications may diminish viral stability and limit viral production, leading to low titers.

4.2 Use of adapters: Antibody/ligand

Another technique consists in fusing special adapters or proteins to the envelope proteins. These adapters determine the affinity of the vector for the target.

4.2.1 Antibody

A protein can be specifically targeted by the use of specific antibodies, antibody fragments, or single-chain antibodies fused to the viral membrane. There are two main methods for using antibodies to improve targeting by vectors.

- The entire antibody or an antibody fragment directed against both a viral envelope protein and a tumor cell membrane receptor can be used as a bridge to attach the virus to specific cells.
- An antibody fragment (usually the fragment crystallizable region Fc) can be expressed at the viral envelope and the rest of the antibody can be directed against a specific antigen of the target cells.

For prostate cancer gene therapy, Kraaij et al. developed a targeted method based on bi-specific antibodies constructed as conjugates between an anti-adenovirus fiber knob Fab' fragment and an anti-prostate specific membrane antigen (PSMA) (Kraaij et al., 2005). These bi-functional antibodies, used as a bridge between capsid proteins and cell surface receptors, were selective for the prostate cancer cell lines. They may hold promise for gene therapy of prostate cancer.

Another strategy, developed by Zhang et al., consists in binding trastuzumab (or Herceptin®, a monoclonal antibody directed against the human epidermal growth factor receptor (HER-2)) to the lentivirus envelope. Thus, the vector targets cells that overexpress HER-2, such as prostate cancer cells, to which it delivers the transgene. Zhang et al. engineered these lentiviruses to express thymidine kinase and showed that prostate cancer cell lines infected by these lentiviruses became vulnerable to ganciclovir. (Zhang et al., 2009) Poulin et al. worked on a new adenoviral vector and investigated the usefulness of capsid protein IX (a minor protein of the adenoviral capsid) as a platform for presenting single-chain variable-fragment antibodies and single-domain antibodies for virus targeting. Given the ability of this protein to fuse to large polypeptides, Poulin et al. decided to test large targeting ligands such as antibodies. Presence in the vector of single-chain variable-fragment antibodies was not sufficient to ensure accurate targeting, contrary to the presence of single-domain antibodies (Poulin et al., 2010).

However, this method is still complicated to use, as it requires the production of monoclonal antibodies, which is both time-consuming and costly. In addition, a specific tumor cell antigen must be obtained, which may be difficult. Finally, the titer of vectors that express the antibody in their envelope is sometimes low.

4.2.2 Ligand

The first attempts at inserting a ligand into the viral membrane used various types of ligand such as growth factors, hormones, and peptides, which were inserted at various sites of the viral surface.

Morizono et al., (Morizono et al., 2009) used a strategy based on a lentiviral vector bearing the biotin-adapter-peptide. In earlier studies of adenoviral or AAV vectors, peptides that were biotinylation substrates were inserted and associated with biotinylated sites, bound avidin, neutravidin, or streptavidin. (Parrott et al., 2003; Pereboeva et al., 2007; Stachler et al., 2008)

Similarly, Liu and colleagues (Liu et al., 2011) used a serotype 5 adenoviral vector (Ad5) whose fiber knob was deleted and replaced by a biotin-acceptor peptide. The advantage of this new adenoviral vector is that no CAR-dependent cell uptake and transduction occurs; moreover when the vector is biotinylated, biotinylated antibodies can be used to achieve targeting. AAV vectors can also be biotinylated.

A hybrid approach using an antibody and a protein ligand has been described in two papers by a group working at the University of California, Los Angeles. (Joo & Wang, 2008), (L. Yang et al., 2006). This group of researchers engineered a lentiviral vector whose surface bears two distinct molecules, an antibody conferring target specificity to the engineered vector and a pH-dependent fusogenic protein that allows the engineered vector to penetrate the target cells. Evaluation by image processing showed highly specific incorporation of this lentivirus into the cells.

Hajitou et al. (Hajitou et al., 2006) developed an AAV vector combined with a double cyclic peptide (RGD-4C) of an fd-tet phage. Their aim was to target αV integrins, a cell surface receptor that is overexpressed in tumors and interacts with the RGD peptide. The native tropism of AAV for mammalian cells is eliminated, since there is no AAV capsid formation and the ligand peptides allow homing to tissue specific receptors. To obtain chimeric viruses, Hajitou et al. inserted an eukaryotic gene cassette from the AAV into an intergenomic region of the RGD-4C phage. The vector was functional and efficiently targeted human Kaposi sarcoma (KS 1767 cells) grafted in nude mice *in vivo*. Using a ganciclovir cytotoxicity strategy, Hajitou et al. obtained a decrease in tumor volume in mice receiving this vector compared with those given a non-specific vector. Using the same strategy, Bauerschmitz et al. (Bauerschmitz et al., 2002) used an adenovirus modified with a RGD domain to target ovarian cancer cells. As seen with the other approaches involving transductional targeting, limited viral production and stability may occur when the viral envelope is modified.

4.3 Tissue-specific promoter

A promoter is a DNA region that is located upstream of the gene and plays a key role in regulating gene expression. The insertion of a cell-specific regulated promoter upstream from the transgene may limit the expression of the promoter to the targeted cells. Several cancer-specific promoters have been found effective in cancer gene therapy, including prostate stem cell antigen (PSCA) promoter in prostate cancer (Petrigliano et al., 2009), carcinoembryonic antigen (CEA) promoter in gastric cancer (Tanaka et al., 2006), and alpha-fetoprotein (AFP) enhancer and albumin promoter in hepatocellular carcinoma (He et al., 2000).

These promoters are tissue-dependent, however. A universal tumor-specific promoter targeting tumor cells of any origin would be of considerable interest. For instance, given that hypoxia is a common physiological feature of tumor tissue, an optimized hypoxia-responsive promoter (OBHRE) may be effective in increasing the therapeutic window of cytotoxic cancer gene therapy (Binley et al., 2003). In a range of cell types, this promoter expresses high levels of transgene in hypoxic tissue but has minimal activity in normoxia. Moreover, the OBHRE promoter in a recombinant adenovirus allowed high-level expression of the transgene in tumor cells but was not expressed in normal tissues such as the liver, spleen, lung, and kidney. Binley et al. developed a GDEPT strategy using CYP2B6 or thymidine kinase as the transgene in combination with CPA and ganciclovir, respectively. Direct administration of the gene therapy vector containing OBHRE into established tumor models was effective, and this method limited the toxic effects due to hepatic sequestration of the adenovirus.

A characteristic promoter of cancer cells is the prostate stem cell antigen (PSCA) promoter. Petrigliano et al. (Petrigliano et al., 2009) used the PSCA promoter to develop a lentiviral

vector targeting prostate cells. PSCA is consistently expressed by high-grade prostate intraepithelial neoplasias and invasive prostate cancers (Watabe et al., 2002). The lentiviral vector carried a cytotoxic thymidine kinase gene and was combined with ganciclovir treatment. Lentiviral gene therapy vector driven by a short PSCA promoter induced prostate-specific cellular toxicity *in vivo* and *in vitro*. This strategy could be used to treat local and advanced metastatic prostate cancer.

However, one of the main problems with the specific promoter strategy is that faithful reconstitution of a complete gene sequence promoter can be difficult. Moreover, transcriptional targeting cannot prevent the sequestration of therapeutic viruses in normal tissues, which may result in toxicity and loss of efficacy.

5. A new strategy for viral vector targeting: micro RNAs (miRNA)

In addition to the above-mentioned methods, microRNAs (miRNAs) may hold potential for improving viral vector targeting, as they are involved in the post-transcriptional regulation of gene expression.

5.1 microRNAs (miRNAs)

The small non-coding RNAs (~20-25 nucleotides) known as miRNAs regulate gene expression at the post-transcriptional level. They are involved in a variety of biological processes including development, differentiation, apoptosis, and cell proliferation. They repress gene expression by binding to their complementary target sites in mRNAs, thereby increasing the degradation or preventing the translation of the transcripts. Thus, cells that express an miRNA complementary to an mRNA do not express the protein coded by this mRNA: miRNAs are endogenous negative gene regulators. (Figure 3).

In 1993, miRNAs were identified for the first time, in the nematode *Caenorhabditis elegans*, in which they were encoded by the *lin-4* and were complementary to mRNA for the *lin-14* gene (R. C. Lee et al., 1993). The *lin-4* gene product is a small RNA of 22 nucleotides (i.e., a miRNA) that is specific of the 3'UTR of the *lin-14* gene and therefore inhibits the production of the *lin-14* protein, thus preventing the transition from larval stage L1 to stage L2. Since the discovery of miRNAs, their mechanisms of action and biogenesis have been studied in detail, and they have been shown to play a major role in physiological processes, development, and disease.

Briefly, miRNA biogenesis involves four stages: transcription of pri-miRNA; cleavage by Drosha to release a precursor pre-miRNA; export of the precursor to the cytoplasm; and cleavage of the pre-miRNA precursor by Dicer. All miRNAs are processed from precursor molecules called pri-miRNAs (Y. Lee et al., 2002), which are transcribed from independent miRNA genes or are portions of introns of protein-coding RNA polymerase II transcripts. Typically, a single pri-miRNA often contains sequences of several different miRNAs.

These pri-miRNAs of about 100 nucleotides are folded into hairpin structures and characterized by imperfectly base-paired stems. These molecules are then processed by a multiprotein complex including the RNase III type endonuclease Drosha and DiGeorge syndrome critical region gene 8 (DGCR 8). The hairpin structures are recognized in the nucleus by DGCR 8, a double-stranded RNA-binding protein (dsRBP). DGCR8 and the Drosha complex process the pri-miRNAs to pre-miRNA hairpins composed of about 70 nucleotides. Pre-miRNAs are then transported from the nucleus to the cytoplasm by exportin 5. In the cytoplasm, they undergo a final maturation step consisting in cleavage by

Dicer, which is complexed with TAR RNA binding protein (TRBP). This cleavage step releases an miRNA duplex of about 20 nucleotides. Mature miRNAs are integrated into a ribonucleoprotein complex called RNA induced silencing complex (RISC) or miRNA-induced silencing complex (miRISC). The components of miRISC complexes are mature miRNAs, Dicer and TRBP proteins, and proteins of the Argonaute family (AGO).

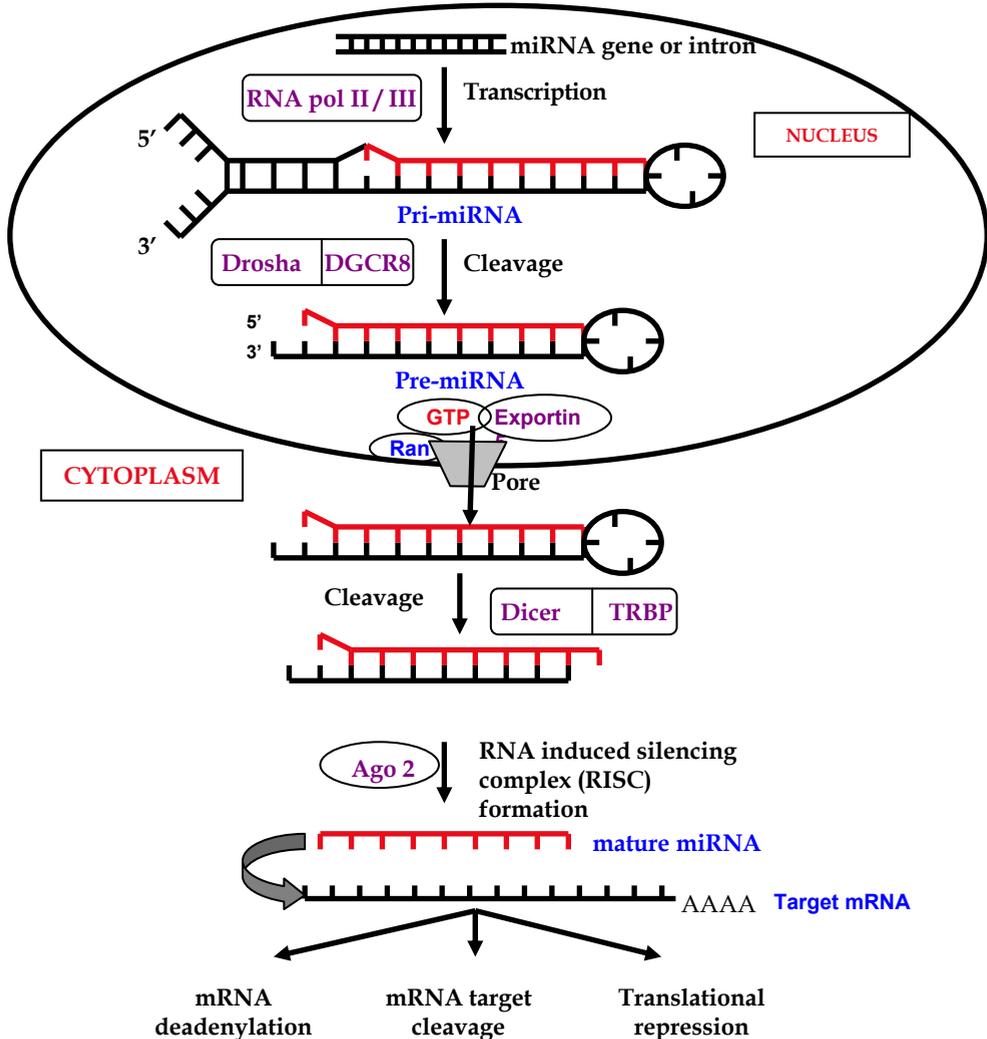


Fig. 3. Principle of miRNA biogenesis

AGO proteins represent the key components of miRISCs; in mammals, four AGO proteins (AGOs 1, 2, 3, and 4) have been identified. They are involved in the miRNA repression function via protein synthesis repression, whereas only AGO2 contributes to the RNA interference (RNAi) function. (Jaskiewicz & Filipowicz, 2008).

Binding of miRNAs to complementary target sites on mRNAs prevents the translation of the transcript or accelerates its decay. The regulation of miRNAs depends on the binding of the first 2 – 8 bases of their mature sequence to the 3'UTR of target genes. To date, 1048 human miRNA precursor sequences have been deposited in the miRBase (<http://www.mirbase.org>) (Kozomara & Griffiths-Jones)

There is now sound evidence that miRNAs are involved in the pathogenesis of conditions such as cancer and inflammatory responses. It has been shown that miRNA expression is deregulated in cancer cells. The differences in miRNA expression between normal and malignant cells may be related to the location of miRNA genes in cancer-associated regions, to epigenetic mechanisms, and to alterations in the miRNA processing machinery (Calin & Croce, 2006). Several studies suggest that miRNAs may contribute to oncogenesis by acting either as tumor suppressors (excessive regulation) or as oncogenes (insufficient regulation).

5.2 Targeting strategy using miRNA

Recently, researchers have started to evaluate endogenous miRNA-mediated regulation as a means of targeting the expression of exogenous genes. Naldini and co-workers demonstrated that endogenous miRNAs could be broadly exploited to regulate transgene expression in various cell lines. This very elegant approach to the control of protein expression relies on the potent regulatory properties of miRNAs. Several studies demonstrated that miRNA expression in cancer cells is deregulated compared to normal cells. The idea is to use this deregulation to modulate the expression of the transgene (B. D. Brown et al., 2007a) (Figure 4). Naldini and colleagues first developed a vector characterized by suppression of transgene expression in hematopoietic cells. The vector contains target sequences for the hematopoietic cell-specific miRNA miR 142-3p; thus, transgene expression is specifically suppressed in all hematopoietic cell lines but is not affected in other cell types. (B. D. Brown et al., 2007a)

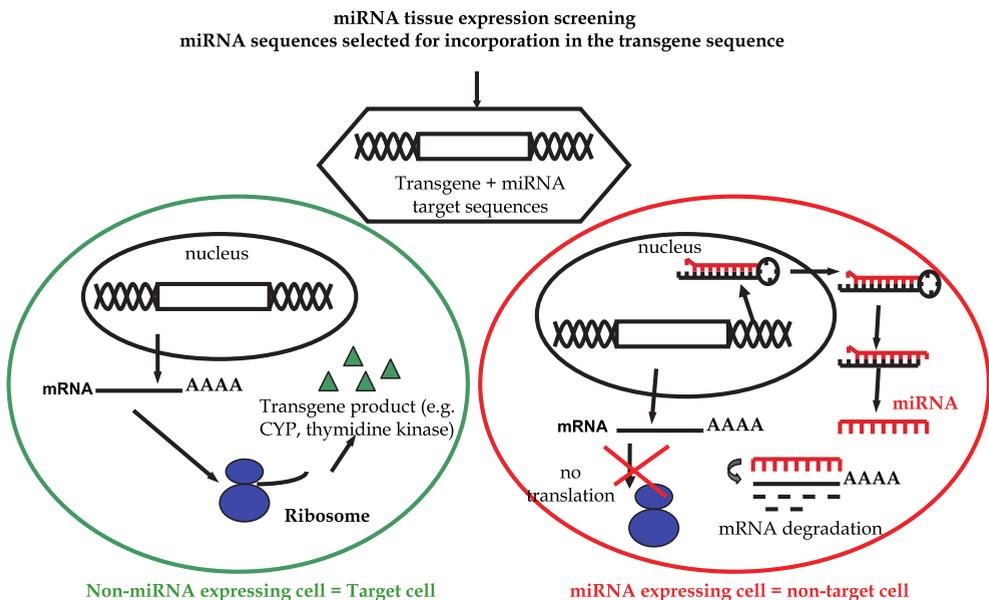


Fig. 4. Principle of miRNA targeting strategy

During the development of this technique, one issue was determination of the amount of endogenous miRNA needed to obtain effective target mRNA suppression. Brown et al., (B. D. Brown et al., 2007b) investigated this issue and concluded that target suppression depended on a threshold miRNA concentration.

Suzuki et al., (Suzuki et al., 2008) worked on a suicide gene therapy strategy based on the herpes simplex virus thymidine kinase (HSVtk) gene and ganciclovir (GCV), with adenoviral vectors. Based on the literature and their experiments, they showed that intratumorally injected adenoviral vectors were disseminated into the systemic circulation and transduced in the liver, resulting in hepatotoxicity. They therefore decided to produce a vector capable of preventing the hepatotoxicity of adenoviruses without altering the antitumor effects of suicide gene therapy. They hypothesized that insertion of sequences complementary to miR122a (which is highly expressed in the liver) into the 3'-UTR of a transgene expression cassette in adenoviral vectors would reduce hepatic transduction without affecting transgene expression in the tumor.

They constructed several vectors; among them, one had four tandem copies of sequences with perfect complementarities to miR122a. The copy number of miRNA target sequences is expected to play an important role in the regulation of transgene expression. An increase in the number of miRNA sequences leads to greater suppression of transgene expression (Doench et al., 2003); thus, four copies are better than two (B. D. Brown et al., 2007b). However, considerable work remains needed to determine the best number of copies and the best spacing elements between tandem copies of miRNA.

Simultaneously, Ylosmaki et al. have developed an adenoviral vector containing sequences complementary to miR 122. They tested the expression of a protein encoded by the vector in Huh7 cells. Huh7 cells resemble normal hepatocytes in that they have a high level of miR 122 expression. As mentioned previously, this strategy prevented transgene expression in the liver, thus avoiding adenovirus-induced hepatotoxicity.

An increasing number of studies combine tissue promoter regulation with miRNA regulation. For instance, Wu C et al. (Wu et al., 2009) developed a baculoviral vector, a strategy that could be extended to other viral vectors. To target glioblastoma cells, they used thymidine kinase/ganciclovir, and a glial fibrillary acidic protein (GFAP) gene promoter. Expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene was controlled by adding the repeated target sequences of three miRNAs that are enriched in astrocytes but downregulated in glioblastoma cells. To determine which miRNA sequences should be used, they reviewed the literature on miRNA expression in gliomas and normal brain tissues.

Downregulated miRNAs are miR 128, 137, 299, 31, 107, 132, 133a, 133b, 154, 323, 330, 127, 134, 181a, and 181b (Ciafre et al., 2005) (Silber et al., 2008); there is only one upregulated miRNA, namely, miR 10b. Wu and colleagues used these results to construct targeting vectors. Suicide gene expression controlled by specific miRNA sequences exerted selective cellular effects *in vitro* and *in vivo*. Glioma cells were specifically targeted, and ganciclovir was toxic in these cells. Wu et al. concluded that incorporating miRNA regulation into a transcriptional targeting vector provided a high level of control over transgene expression. The crucial steps in developing an efficient system include selection of a relevant tissue-specific promoter and determination of relative miRNA expressions in tumor cells and their normal counterparts. The next step is selection of miRNAs that are downregulated in tumor cells and expressed at high levels in normal cells.

This approach has also been studied in another cancer treatment strategy based on oncolytic viruses. Thus, Leja et al., (Leja et al., 2010) worked on an oncolytic adenovirus. Their aim was to abolish the hepatic tropism of the adenovirus, and therefore the occurrence of hepatotoxicity, without altering the antitumoral effects in neuroendocrine cells. They used not only a specific promoter but also miR 122 sequences. Similar to Suzuki et al. (Suzuki et al., 2008) and Ylosmaki et al. (Ylosmaki et al., 2008), Leja et al. found that hepatic tropism and expression were abolished.

Edge et al. (Edge et al., 2008) used another oncolytic virus, the vesicular stomatitis virus (VSV). They incorporated let-7 miRNA complementary sequences within the VSV to eliminate toxicity for normal cells without preventing expression in cancer cells *in vitro* and *in vivo*.

This approach has also been found effective in diseases other than cancer. Thus, an miR 142-3p regulated lentiviral vector has been used in hemophilia B (B. D. Brown et al., 2007a); miR 122 regulated transgene expression improved targeting to the heart (Geisler et al.); and a lentiviral vector containing miR 142 sequences regulated UGT1A1 expression in the liver (Schmitt et al., 2010)).

6. Conclusion

Cancer gene therapy and, in particular, suicide gene therapy holds considerable promise as a substitute for conventional chemotherapy. However, several aspects of gene therapy remain to be improved. In particular, there is a need for developing enzymes such as mutant forms of human enzymes that are more efficient than the wild-type enzyme regarding specificity and kinetics for the prodrugs, as exemplified by our CYP2B6TM-RED and CPA combination.

The viral vectors used to achieve gene transfer may have a broad tropism and may therefore infect healthy tissue. An insufficient ability of vectors to target tumors has contributed to slow the development of cancer gene therapy. Researchers have therefore expended considerable effort to improve viral vector targeting, as discussed in this chapter. Moreover, the accumulation of knowledge about miRNAs has opened up a new field of gene regulation. Using miRNA properties to regulate transgene expression, and therefore targeting, in cancer gene therapy is both extremely elegant and quite simple. Future strategies should combine several targeting methods (Figure 5). Several groups have already constructed vectors characterized by a double targeting system consisting of specific promoters and miRNA. Today, the development of vectors characterized by both transductional and transcriptional targeting is within reach. It is reasonable to hope that safe vectors capable of specifically targeting cancer cells will be available soon and will open up new horizons for cancer gene therapy.

Last, new prodrugs with greater effectiveness are needed. Given that hypoxia is a common environmental feature in solid tumors, prodrugs specifically activated by hypoxia should be designed. For example, our previously described fusion gene expresses both CYP2B6 and RED catalytic activities, and we plan to use CPA treatment in combination with additional prodrugs known to be activated to cytotoxic metabolites under hypoxic conditions, such as AQ4N by CYP 2B6 or mitomycin C and tirapazamine by RED (J. M. Brown & Wang, 1998; Cavazzana-Calvo et al., 2010; Friery et al., 2000; McErlane et al., 2005).

Recent clinical trials confirmed the usefulness of cancer gene therapy and its potential for application in the clinical setting, as a substitute for conventional chemotherapy or, if the

result is only a decrease in tumor size, in combination with surgery and radiotherapy. We hope that the expected improvements in cancer gene therapy outlined above will further facilitate the use of this strategy for treating solid tumors.

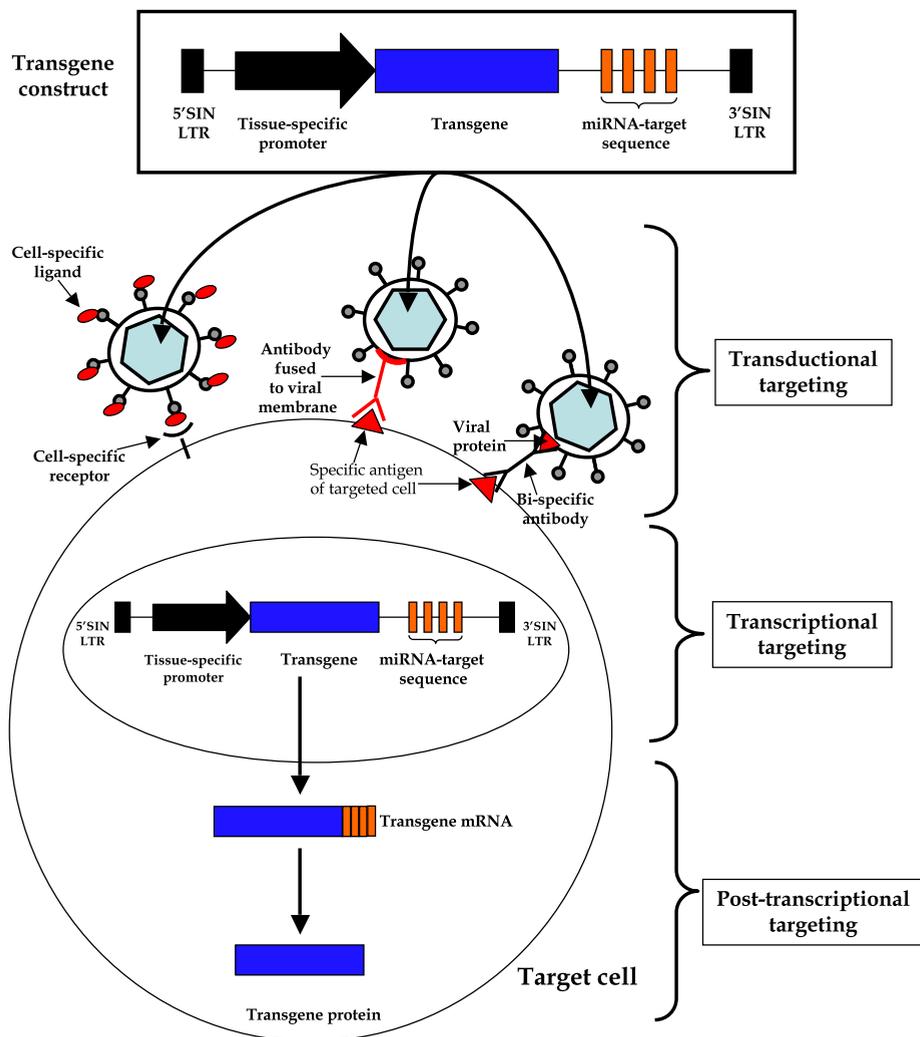


Fig. 5. Summary of various strategies for targeting lentiviral expression to cancer cells

7. References

Adachi, Y., Yoshio-Hoshino, N., Aoki, C., & Nishimoto, N. (2010). VEGF targeting in mesotheliomas using an interleukin-6 signal inhibitor based on adenovirus gene delivery. *Anticancer Res*, 30(6), pp. 1947-1952.

- Alba, R., Bosch, A., & Chillon, M. (2005). Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther*, 12 Suppl 1, pp. S18-27.
- Aleman, R., & Curiel, D. T. (2001). CAR-binding ablation does not change biodistribution and toxicity of adenoviral vectors. *Gene Ther*, 8(17), pp. 1347-1353.
- Altaner, C. (2008). Prodrug cancer gene therapy. *Cancer Lett*, 270(2), pp. 191-201.
- Asokan, A., Hamra, J. B., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M., & Samulski, R. J. (2006). Adeno-associated virus type 2 contains an integrin alpha5beta1 binding domain essential for viral cell entry. *J Virol*, 80(18), pp. 8961-8969.
- Bauerschmitz, G. J., Lam, J. T., Kanerva, A., Suzuki, K., Nettelbeck, D. M., Dmitriev, I., Krasnykh, V., Mikheeva, G. V., Barnes, M. N., Alvarez, R. D., Dall, P., Aleman, R., Curiel, D. T., & Hemminki, A. (2002). Treatment of ovarian cancer with a tropism modified oncolytic adenovirus. *Cancer Res*, 62(5), pp. 1266-1270.
- Bergelson, J. M. (1999). Receptors mediating adenovirus attachment and internalization. *Biochem Pharmacol*, 57(9), pp. 975-979.
- Binley, K., Askham, Z., Martin, L., Spearman, H., Day, D., Kingsman, S., & Naylor, S. (2003). Hypoxia-mediated tumour targeting. *Gene Ther*, 10(7), pp. 540-549.
- Brown, B. D., Cantore, A., Annoni, A., Sergi, L. S., Lombardo, A., Della Valle, P., D'Angelo, A., & Naldini, L. (2007a). A microRNA-regulated lentiviral vector mediates stable correction of hemophilia B mice. *Blood*, 110(13), pp. 4144-4152.
- Brown, B. D., Gentner, B., Cantore, A., Colleoni, S., Amendola, M., Zingale, A., Baccharini, A., Lazzari, G., Galli, C., & Naldini, L. (2007b). Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state. *Nat Biotechnol*, 25(12), pp. 1457-1467.
- Brown, J. M., & Wang, L. H. (1998). Tirapazamine: laboratory data relevant to clinical activity. *Anticancer Drug Des*, 13(6), pp. 529-539.
- Calin, G. A., & Croce, C. M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*, 6(11), pp. 857-866.
- Candolfi, M., Xiong, W., Yagiz, K., Liu, C., Muhammad, A. K., Puntel, M., Foulad, D., Zadmehr, A., Ahlzadeh, G. E., Kroeger, K. M., Tesarfreund, M., Lee, S., Debinski, W., Sareen, D., Svendsen, C. N., Rodriguez, R., Lowenstein, P. R., & Castro, M. G. (2010). Gene therapy-mediated delivery of targeted cytotoxins for glioma therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(46), pp. 20021-20026.
- Cartier, N., Hacein-Bey-Abina, S., Bartholomae, C. C., Veres, G., Schmidt, M., Kutschera, I., Vidaud, M., Abel, U., Dal-Cortivo, L., Caccavelli, L., Mahlaoui, N., Kiermer, V., Mittelstaedt, D., Bellesme, C., Lahlou, N., Lefrere, F., Blanche, S., Audit, M., Payen, E., Leboulch, P., l'Homme, B., Bougneres, P., Von Kalle, C., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M., & Aubourg, P. (2009). Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science*, 326(5954), pp. 818-823.
- Cavazzana-Calvo, M., Payen, E., Negre, O., Wang, G., Hehir, K., Fusil, F., Down, J., Denaro, M., Brady, T., Westerman, K., Cavallesco, R., Gillet-Legrand, B., Caccavelli, L., Sgarra, R., Maouche-Chretien, L., Bernaudin, F., Girot, R., Dorazio, R., Mulder, G. J., Polack, A., Bank, A., Soulier, J., Larghero, J., Kabbara, N., Dalle, B., Gourmel, B., Socie, G., Chretien, S., Cartier, N., Aubourg, P., Fischer, A., Cornetta, K., Galacteros, F., Beuzard, Y., Gluckman, E., Bushman, F., Hacein-Bey-Abina, S., & Leboulch, P. (2010). Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. *Nature*, 467(7313), pp. 318-322.

- Chen, S. T., Iida, A., Guo, L., Friedmann, T., & Yee, J. K. (1996). Generation of packaging cell lines for pseudotyped retroviral vectors of the G protein of vesicular stomatitis virus by using a modified tetracycline inducible system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(19),pp. 10057-10062.
- Ciafre, S. A., Galardi, S., Mangiola, A., Ferracin, M., Liu, C. G., Sabatino, G., Negrini, M., Maira, G., Croce, C. M., & Farace, M. G. (2005). Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 334(4),pp. 1351-1358.
- DePolo, N. J., Reed, J. D., Sheridan, P. L., Townsend, K., Sauter, S. L., Jolly, D. J., & Dubensky, T. W., Jr. (2000). VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human serum. *Mol Ther*, 2(3),pp. 218-222.
- Doench, J. G., Petersen, C. P., & Sharp, P. A. (2003). siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev*, 17(4),pp. 438-442.
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., & Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol*, 72(11),pp. 8463-8471.
- Edge, R. E., Falls, T. J., Brown, C. W., Lichty, B. D., Atkins, H., & Bell, J. C. (2008). A let-7 MicroRNA-sensitive vesicular stomatitis virus demonstrates tumor-specific replication. *Mol Ther*, 16(8),pp. 1437-1443.
- Einfeld, D. A., Schroeder, R., Roelvink, P. W., Lizonova, A., King, C. R., Kovesdi, I., & Wickham, T. J. (2001). Reducing the native tropism of adenovirus vectors requires removal of both CAR and integrin interactions. *J Virol*, 75(23),pp. 11284-11291.
- Fischer, A., Hacein-Bey-Abina, S., & Cavazzana-Calvo, M. (2010). 20 years of gene therapy for SCID. *Nat Immunol*, 11(6),pp. 457-460.
- Fitzsimmons, S. A., Workman, P., Grever, M., Paull, K., Camalier, R., & Lewis, A. D. (1996). Reductase enzyme expression across the National Cancer Institute Tumor cell line panel: correlation with sensitivity to mitomycin C and EO9. *J Natl Cancer Inst*, 88(5),pp. 259-269.
- Fraiser, L. H., Kanekal, S., & Kehrer, J. P. (1991). Cyclophosphamide toxicity. Characterising and avoiding the problem. *Drugs*, 42(5),pp. 781-795.
- Frecha, C., Szecsi, J., Cosset, F. L., & Verhoeyen, E. (2008). Strategies for targeting lentiviral vectors. *Curr Gene Ther*, 8(6),pp. 449-460.
- Friery, O. P., Gallagher, R., Murray, M. M., Hughes, C. M., Galligan, E. S., McIntyre, I. A., Patterson, L. H., Hirst, D. G., & McKeown, S. R. (2000). Enhancement of the anti-tumour effect of cyclophosphamide by the bioreductive drugs AQ4N and tirapazamine. *Br J Cancer*, 82(8),pp. 1469-1473.
- Geisler, S. B., Green, K. J., Isom, L. L., Meshinchi, S., Martens, J. R., Delmar, M., & Russell, M. W. (2010). Ordered assembly of the adhesive and electrochemical connections within newly formed intercalated disks in primary cultures of adult rat cardiomyocytes. *J Biomed Biotechnol*, 2010,pp. 624719.
- Gervot, L., Rochat, B., Gautier, J. C., Bohnenstengel, F., Kroemer, H., de Berardinis, V., Martin, H., Beaune, P., & de Waziers, I. (1999). Human CYP2B6: expression, inducibility and catalytic activities. *Pharmacogenetics*, 9(3),pp. 295-306.

- Grimm, D., & Kleinschmidt, J. A. (1999). Progress in adeno-associated virus type 2 vector production: promises and prospects for clinical use. *Hum Gene Ther*, 10(15),pp. 2445-2450.
- Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., Radford, I., Villeval, J. L., Fraser, C. C., Cavazzana-Calvo, M., & Fischer, A. (2003). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*, 348(3),pp. 255-256.
- Hajitou, A., Trepel, M., Lilley, C. E., Soghomonyan, S., Alauddin, M. M., Marini, F. C., 3rd, Restel, B. H., Ozawa, M. G., Moya, C. A., Rangel, R., Sun, Y., Zaoui, K., Schmidt, M., von Kalle, C., Weitzman, M. D., Gelovani, J. G., Pasqualini, R., & Arap, W. (2006). A hybrid vector for ligand-directed tumor targeting and molecular imaging. *Cell*, 125(2),pp. 385-398.
- He, P., Tang, Z. Y., Ye, S. L., Liu, B. B., & Liu, Y. K. (2000). The targeted expression of interleukin-2 in human hepatocellular carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res*, 19(2),pp. 183-187.
- Huser, D., Gogol-Doring, A., Lutter, T., Weger, S., Winter, K., Hammer, E. M., Cathomen, T., Reinert, K., & Heilbronn, R. (2010). Integration preferences of wildtype AAV-2 for consensus rep-binding sites at numerous loci in the human genome. *PLoS Pathog*, 6(7),pp. e1000985.
- Jaskiewicz, L., & Filipowicz, W. (2008). Role of Dicer in posttranscriptional RNA silencing. *Curr Top Microbiol Immunol*, 320,pp. 77-97.
- Joo, K. I., & Wang, P. (2008). Visualization of targeted transduction by engineered lentiviral vectors. *Gene Ther*, 15(20),pp. 1384-1396.
- Jounaidi, Y. (2002). Cytochrome P450-based gene therapy for cancer treatment: from concept to the clinic. *Curr Drug Metab*, 3(6),pp. 609-622.
- Jounaidi, Y., Chen, C. S., Veal, G. J., & Waxman, D. J. (2006). Enhanced antitumor activity of P450 prodrug-based gene therapy using the low Km cyclophosphamide 4-hydroxylase P450 2B11. *Mol Cancer Ther*, 5(3),pp. 541-555.
- Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. (2011). miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 39(Database issue),pp. D152-157.
- Kraaij, R., van Rijswijk, A. L., Oomen, M. H., Haisma, H. J., & Bangma, C. H. (2005). Prostate specific membrane antigen (PSMA) is a tissue-specific target for adenoviral transduction of prostate cancer in vitro. *Prostate*, 62(3),pp. 253-259.
- Kutner, R. H., Zhang, X. Y., & Reiser, J. (2009). Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. *Nat Protoc*, 4(4),pp. 495-505.
- Lane, D. P., Cheok, C. F., & Lain, S. (2010). p53-based cancer therapy. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(9),pp. a001222.
- Langford, C. A. (1997). Complications of cyclophosphamide therapy. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 254(2),pp. 65-72.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5),pp. 843-854.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J. T., Kim, S., & Kim, V. N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*, 21(17),pp. 4663-4670.

- Leja, J., Nilsson, B., Yu, D., Gustafson, E., Akerstrom, G., Oberg, K., Giandomenico, V., & Essand, M. (2010). Double-detargeted oncolytic adenovirus shows replication arrest in liver cells and retains neuroendocrine cell killing ability. *PLoS One*, 5(1),pp. e8916.
- Liu, H., Wu, L., & Zhou, Z. H. (2011). Model of the trimeric fiber and its interactions with the pentameric penton base of human adenovirus by cryo-electron microscopy. *J Mol Biol*, 406(5),pp. 764-774.
- McErlane, V., Yakkundi, A., McCarthy, H. O., Hughes, C. M., Patterson, L. H., Hirst, D. G., Robson, T., & McKeown, S. R. (2005). A cytochrome P450 2B6 mediated gene therapy strategy to enhance the effects of radiation or cyclophosphamide when combined with the bioreductive drug AQ4N. *J Gene Med*, 7(7),pp. 851-859.
- Michelfelder, S., & Trepel, M. (2009). Adeno-associated viral vectors and their redirection to cell-type specific receptors. *Adv Genet*, 67,pp. 29-60.
- Miletic, H., Fischer, Y. H., Neumann, H., Hans, V., Stenzel, W., Giroglou, T., Hermann, M., Deckert, M., & Von Laer, D. (2004). Selective transduction of malignant glioma by lentiviral vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoproteins. *Hum Gene Ther*, 15(11),pp. 1091-1100.
- Montini, E., Cesana, D., Schmidt, M., Sanvito, F., Bartholomae, C. C., Ranzani, M., Benedicenti, F., Sergi, L. S., Ambrosi, A., Ponzoni, M., Doglioni, C., Di Serio, C., von Kalle, C., & Naldini, L. (2009). The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy. *J Clin Invest*, 119(4),pp. 964-975.
- Morizono, K., Xie, Y., Helguera, G., Daniels, T. R., Lane, T. F., Penichet, M. L., & Chen, I. S. (2009). A versatile targeting system with lentiviral vectors bearing the biotin-adaptor peptide. *J Gene Med*, 11(8),pp. 655-663.
- Naldini, L., Blomer, U., Gally, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., & Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 272(5259),pp. 263-267.
- Nguyen, T. A., Tychopoulos, M., Bichat, F., Zimmermann, C., Flinois, J. P., Diry, M., Ahlberg, E., Delaforge, M., Corcos, L., Beaune, P., Dansette, P., Andre, F., & de Waziers, I. (2008). Improvement of cyclophosphamide activation by CYP2B6 mutants: from in silico to ex vivo. *Mol Pharmacol*, 73(4),pp. 1122-1133.
- Parrott, M. B., Adams, K. E., Mercier, G. T., Mok, H., Campos, S. K., & Barry, M. A. (2003). Metabolically biotinylated adenovirus for cell targeting, ligand screening, and vector purification. *Mol Ther*, 8(4),pp. 688-700.
- Pauwels, K., Gijssbers, R., Toelen, J., Schambach, A., Willard-Gallo, K., Verheust, C., Debyser, Z., & Herman, P. (2009). State-of-the-art lentiviral vectors for research use: risk assessment and biosafety recommendations. *Curr Gene Ther*, 9(6),pp. 459-474.
- Pereboeva, L., Komarova, S., Roth, J., Ponnazhagan, S., & Curiel, D. T. (2007). Targeting EGFR with metabolically biotinylated fiber-mosaic adenovirus. *Gene Ther*, 14(8),pp. 627-637.
- Petrigliano, F. A., Virk, M. S., Liu, N., Sugiyama, O., Yu, D., & Lieberman, J. R. (2009). Targeting of prostate cancer cells by a cytotoxic lentiviral vector containing a prostate stem cell antigen (PSCA) promoter. *Prostate*, 69(13),pp. 1422-1434.
- Portsmouth, D., Hlavaty, J., & Renner, M. (2007). Suicide genes for cancer therapy. *Mol Aspects Med*, 28(1),pp. 4-41.

- Poulin, K. L., Lanthier, R. M., Smith, A. C., Christou, C., Risco Quiroz, M., Powell, K. L., O'Meara, R. W., Kothary, R., Lorimer, I. A., & Parks, R. J. (2010). Retargeting of adenovirus vectors through genetic fusion of a single-chain or single-domain antibody to capsid protein IX. *J Virol*, 84(19),pp. 10074-10086.
- Ricks, D. M., Kutner, R., Zhang, X. Y., Welsh, D. A., & Reiser, J. (2008). Optimized lentiviral transduction of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 17(3),pp. 441-450.
- Russell, W. C. (2009). Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol*, 90(Pt 1),pp. 1-20.
- Schmidt, M., Voutetakis, A., Afione, S., Zheng, C., Mandikian, D., & Chiorini, J. A. (2008). Adeno-associated virus type 12 (AAV12): a novel AAV serotype with sialic acid- and heparan sulfate proteoglycan-independent transduction activity. *J Virol*, 82(3),pp. 1399-1406.
- Schmitt, F., Remy, S., Dariel, A., Flageul, M., Pichard, V., Boni, S., Usal, C., Myara, A., Laplanche, S., Anegon, I., Labrune, P., Podevin, G., Ferry, N., & Nguyen, T. H. (2010). Lentiviral vectors that express UGT1A1 in liver and contain miR-142 target sequences normalize hyperbilirubinemia in Gunn rats. *Gastroenterology*, 139(3),pp. 999-1007, 1007 e1001-1002.
- Schwartz, P. S., & Waxman, D. J. (2001). Cyclophosphamide induces caspase 9-dependent apoptosis in 9L tumor cells. *Mol Pharmacol*, 60(6),pp. 1268-1279.
- Silber, J., Lim, D. A., Petritsch, C., Persson, A. I., Maunakea, A. K., Yu, M., Vandenberg, S. R., Ginzinger, D. G., James, C. D., Costello, J. F., Bergers, G., Weiss, W. A., Alvarez-Buylla, A., & Hodgson, J. G. (2008). miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med*, 6,pp. 14.
- Stachler, M. D., Chen, I., Ting, A. Y., & Bartlett, J. S. (2008). Site-specific modification of AAV vector particles with biophysical probes and targeting ligands using biotin ligase. *Mol Ther*, 16(8),pp. 1467-1473.
- Suzuki, T., Sakurai, F., Nakamura, S., Kouyama, E., Kawabata, K., Kondoh, M., Yagi, K., & Mizuguchi, H. (2008). miR-122a-regulated expression of a suicide gene prevents hepatotoxicity without altering antitumor effects in suicide gene therapy. *Mol Ther*, 16(10),pp. 1719-1726.
- Tanaka, T., Huang, J., Hirai, S., Kuroki, M., Watanabe, N., Tomihara, K., Kato, K., & Hamada, H. (2006). Carcinoembryonic antigen-targeted selective gene therapy for gastric cancer through FZ33 fiber-modified adenovirus vectors. *Clin Cancer Res*, 12(12),pp. 3803-3813.
- Tychopoulos, M., Corcos, L., Genne, P., Beaune, P., & de Waziers, I. (2005). A virus-directed enzyme prodrug therapy (VDEPT) strategy for lung cancer using a CYP2B6/NADPH-cytochrome P450 reductase fusion protein. *Cancer Gene Ther*, 12(5),pp. 497-508.
- Vrancken Peeters, M. J., Perkins, A. L., & Kay, M. A. (1996). Method for multiple portal vein infusions in mice: quantitation of adenovirus-mediated hepatic gene transfer. *Biotechniques*, 20(2),pp. 278-285.
- Watabe, T., Lin, M., Ide, H., Donjacour, A. A., Cunha, G. R., Witte, O. N., & Reiter, R. E. (2002). Growth, regeneration, and tumorigenesis of the prostate activates the PSCA promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(1),pp. 401-406.

- Waxman, D. J., Chen, L., Hecht, J. E., & Jounaidi, Y. (1999). Cytochrome P450-based cancer gene therapy: recent advances and future prospects. *Drug Metab Rev*, 31(2),pp. 503-522.
- Wei, M. X., Tamiya, T., Rhee, R. J., Breakefield, X. O., & Chiocca, E. A. (1995). Diffusible cytotoxic metabolites contribute to the in vitro bystander effect associated with the cyclophosphamide/cytochrome P450 2B1 cancer gene therapy paradigm. *Clin Cancer Res*, 1(10),pp. 1171-1177.
- Wu, Q., Fang, L., Wu, X., Li, B., Luo, R., Yu, Z., Jin, M., Chen, H., & Xiao, S. (2009). A pseudotype baculovirus-mediated vaccine confers protective immunity against lethal challenge with H5N1 avian influenza virus in mice and chickens. *Mol Immunol*, 46(11-12),pp. 2210-2217.
- Yang, L., Bailey, L., Baltimore, D., & Wang, P. (2006). Targeting lentiviral vectors to specific cell types in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(31),pp. 11479-11484.
- Yang, S. H., Cheng, P. H., Sullivan, R. T., Thomas, J. W., & Chan, A. W. (2008). Lentiviral integration preferences in transgenic mice. *Genesis*, 46(12),pp. 711-718.
- Ylosmaki, E., Hakkarainen, T., Hemminki, A., Visakorpi, T., Andino, R., & Saksela, K. (2008). Generation of a conditionally replicating adenovirus based on targeted destruction of E1A mRNA by a cell type-specific MicroRNA. *J Virol*, 82(22),pp. 11009-11015.
- Yu, L., Takenobu, H., Shimozato, O., Kawamura, K., Nimura, Y., Seki, N., Uzawa, K., Tanzawa, H., Shimada, H., Ochiai, T., & Tagawa, M. (2005). Increased infectivity of adenovirus type 5 bearing type 11 or type 35 fibers to human esophageal and oral carcinoma cells. *Oncol Rep*, 14(4),pp. 831-835.
- Yu, L. J., Matias, J., Scudiero, D. A., Hite, K. M., Monks, A., Sausville, E. A., & Waxman, D. J. (2001). P450 enzyme expression patterns in the NCI human tumor cell line panel. *Drug Metab Dispos*, 29(3),pp. 304-312.
- Zhang, K. X., Moussavi, M., Kim, C., Chow, E., Chen, I. S., Fazli, L., Jia, W., & Rennie, P. S. (2009). Lentiviruses with trastuzumab bound to their envelopes can target and kill prostate cancer cells. *Cancer Gene Ther*, 16(11),pp. 820-831.
- Zheng, S., Ulasov, I. V., Han, Y., Tyler, M. A., Zhu, Z. B., & Lesniak, M. S. (2007). Fiber-knob modifications enhance adenoviral tropism and gene transfer in malignant glioma. *J Gene Med*, 9(3),pp. 151-160.

I. DÉVELOPPEMENT D'UNE STRATÉGIE DE RÉGULATION DE L'EXPRESSION DU TRANSGÈNE À L'AIDE DE SÉQUENCES CIBLES DE MICROARN

Ce travail a été réalisé avec Djohra Bouchama que j'ai co-encadrée pendant son master 2 (M2 : janvier - juin 2012).

I.1 LES MICROARN

Les microARN (miARN ou mir) sont de petites molécules d'ARN non codants d'environ 20 nucléotides, qui jouent un rôle essentiel dans le contrôle de l'expression des gènes (Lee et al., 1993).

La biogenèse des miARN comporte quatre étapes principales (**figure 39**). Ils sont transcrits par une ARN polymérase II dans le noyau sous la forme de longs transcrits, les pri-miARN, qui font une centaine de nucléotides, et qui sont majoritairement coiffés et polyadénylés. A ce stade ils contiennent plusieurs structures en épingle à cheveux. Ces pri-miARN sont ensuite pris en charge par une ribonucléase III, Drosha, qui interviendra à l'aide de son co-facteur DGCR8 (DiGeorge syndrome Critical Region gene 8) pour former les pré-miARN, long d'environ 70 nucléotides. Les pré-miARN sont ensuite transloqués de manière active dans le cytosol par l'intermédiaire de l'exportine 5 et de Ran-GTP. Une fois dans le cytosol, ils seront clivés par une seconde ribonucléase III, Dicer, qui va hydrolyser la structure en boucle et engendrer un duplex d'environ 20 nucléotides. On obtient alors un miARN mature qui est transféré au complexe multiprotéique RISC (RNA – induced silencing complex). A ce stade, une hélicase va entrer en jeu pour séparer le double brin du

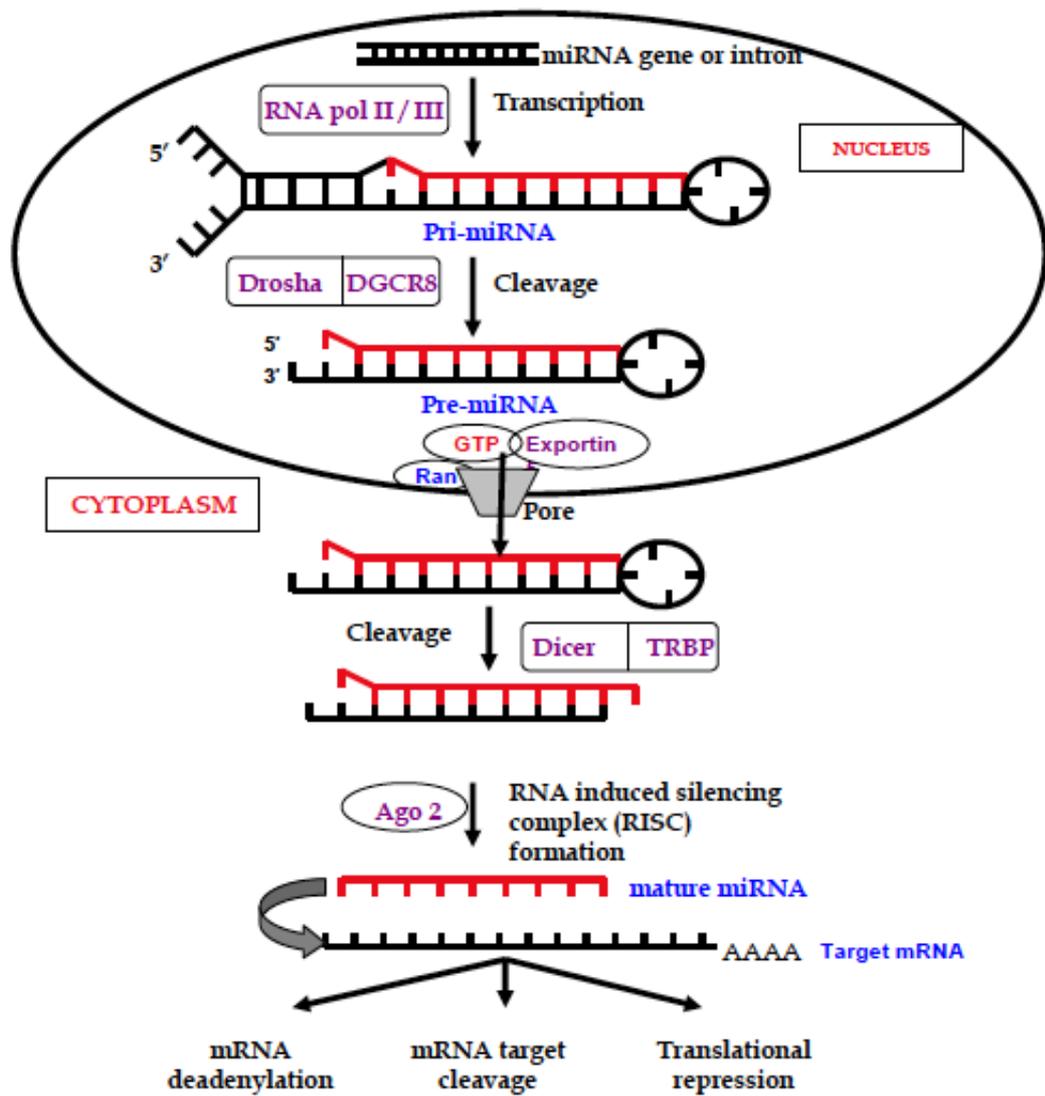


Figure 39 : Biogenèse des microARN

(D'après Touati et al., 2011)

duplex et l'association de protéines de la famille Argonaute (Ago) qui stabilisent le brin monocaténaire du miARN au sein du complexe RISC. (Ogier-Denis et al., 2007)

Ces miARN ne sont pas traduits en protéines, ils vont jouer un rôle dans la régulation de l'expression des protéines. Les miARN comportent en leur extrémité 5' une séquence appelée « seed sequence » qui va servir de guide pour le complexe RISC pour identifier la séquence complémentaire sur l'ARN messenger (ARNm), cible des miARN. Les sites de fixation des miRNA sont souvent situés au niveau de l'extrémité 3' non traduite (3' UTR) des ARNm cibles. La liaison des 2 – 8 premières bases sur la séquence 3'UTR sont déterminantes pour la régulation. Le complexe RISC inhibe alors l'expression du gène par répression de la traduction ou par dégradation de l'ARNm.

I.2 LES MICROARN COMME OUTIL DE RÉGULATION DE L'EXPRESSION DU TRANSGÈNE

Une méthode de régulation de l'expression du transgène hors de sa cible par l'intermédiaire des miARN peut être mise au point

De nombreuses études ont montré que certains miARN étaient sur- ou sous exprimés selon les tissus mais également dans les cellules saines par rapport aux cellules tumorales (Pallante et al., 2010) (Song and Meltzer, 2012) (Zhang et al., 2013) (Markou et al., 2013) (Liu et al., 2013). L'idée est donc d'utiliser ces variations d'expression de miARN entre cellules ainsi que leurs propriétés de régulation de l'expression des gènes pour moduler l'expression d'un transgène. Pour cela, des séquences cibles d'un (ou plusieurs) miARN seront incluses dans la région 3' non traduite du transgène ce qui permettra l'expression du transgène dans les cellules qui n'exprime(nt) pas ce (ou ces) miARN (cellules tumorales) et l'inhibition de l'expression du transgène dans les cellules qui l'expriment (cellules saines) (**figure 40**)

(voir chapitre publié dans *Current cancer treatment: Novel beyond conventional approaches*).

A l'origine, l'utilisation des miARN pour réguler l'expression issue d'un transgène, a été mise au point par l'équipe de Luigi Naldini en 2007 (Brown et al., 2007b) (Brown et al., 2007a). Leur but était d'inhiber l'expression d'un transgène au niveau de cellules hématopoïétiques. En effet, ils avaient mis en évidence le développement d'une réaction immunitaire dirigée contre le transgène médiée par l'expression de celui-ci dans les cellules hématopoïétiques. Ils ont alors décidé d'insérer des séquences cibles du mir 142-3p exprimé très fortement dans les lignées hématopoïétiques. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence une inhibition spécifique de l'expression du transgène au niveau des cellules hématopoïétiques mais pas dans les autres types cellulaires ainsi qu'une diminution de la réaction immunitaire dirigée contre le transgène.

Cette technique a déjà été testée dans des stratégies GDEPT (Wu et al., 2009) (Suzuki et al., 2008). Par exemple, Suzuki et al., en 2008 (Suzuki et al., 2008), ont utilisé une technique de gène suicide (Tk/ganciclovir) dans le traitement de cancer du foie (hépatome), en utilisant comme vecteur du transgène des adénovirus. Ils ont montré qu'une injection intratumorale d'adénovirus recombinant entraînait sa dissémination via la circulation systémique et provoquait des toxicités hépatiques. Pour limiter cette hépatotoxicité, ils ont alors décidé d'ajouter en position 3' non traduite de la séquence de leur transgène, des séquences cibles du mir 122a, qui est sur-exprimé dans le foie. L'ajout de ces séquences a permis d'inhiber l'expression du transgène dans le foie et a ainsi permis de limiter significativement l'hépatotoxicité.

Des études ont montré que pour l'inhibition soit efficace, ces séquences cibles doivent être répétées quatre fois (Doench et al., 2003).

PRÉSENTATION DU TRAVAIL

Nous avons décidé de développer une stratégie d'inhibition de l'expression du gène de fusion CYP2B6TM-RED dans les tissus sains. La première étape a consisté à sélectionner dans la littérature des miARN candidats non exprimés dans les lignées tumorales humaines de poumon et surexprimés dans des tissus sains chez l'Homme. Nous avons vérifié par qRT-PCR que ces miARN sélectionnés (mir 26a, mir 142 et let-7a) n'étaient pas exprimés dans les ARN totaux de différentes lignées pulmonaires humaines mais l'étaient dans des ARN totaux de tissus sains (poumon, foie, cellules sanguines). Nous avons sélectionné le miARN dont l'expression est la plus différente (mir 142) et nous avons inséré 4 copies de la séquence complémentaire de ce miARN dans la région 3' non-traduite du gène rapporteur de la Green Fluorescent Protein (GFP) cloné dans le plasmide pGL3. Ce plasmide a alors été transfecté dans des lignées tumorales pulmonaires humaines A549, et nous avons vérifié les niveaux d'expression de la GFP avec ou sans co-transfection d'un plasmide d'expression du mir142 (pmir 142).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

ARN TOTAUX DE TISSUS SAINS ET TUMORAUX

Les ARN totaux proviennent de cellules de tissus sains humains adultes (CliniSciences). Trois types tissulaires ont été utilisés : poumon issu de cinq donneurs, foie issu de cinq donneurs et de leucocytes issu d'un donneur.

EXTRACTION DES ARN TOTAUX

L'extraction des ARN totaux y compris les miRNA a été réalisée à l'aide du kit miRVANA miRNA isolation kit (Applied Biosystems) ou à l'aide du kit miRNeasy mini kit (Qiagen).

QUANTIFICATION DES MICROARN PAR PCR QUANTITATIVE (QPCR)

Sur les ARN totaux, une transcription inverse « amorce-spécifique » (pour chacun des miARN étudié) a été réalisée à l'aide du kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystem).

Le niveau d'expression des miRNA est quantifié par PCR quantitative à l'aide de sondes fluorescentes Taqman spécifiques de chaque miRNA (Applied Biosystem). L'ARN nucléolaire RNU 48 a été utilisé comme ARN de référence.

SYNTHÈSE DE LA SÉQUENCE COMPLÉMENTAIRE DU MIRNA 142

Les séquences, sens et antisens, de hsa-mir-142 (mir 142) sont obtenus dans la base de données mirbase (Stem-loop sequence MI0000458) http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000458.

La synthèse des oligonucléotides, sens et antisens, est réalisée de telle sorte que leur appariement fasse apparaître les sites de clonage ouverts XbaI et FseI. Les oligonucléotides, 4x.mir-142.Target (mir 142T), contiennent 4 copies d'une séquence cible (soulignée) parfaitement complémentaire au microARN (Doench et al., 2003).

-Brin sens :

5'ctagaGTAGTGCTTTCTACTTTATGCGATGTAGTGCTTTCTACTTTATGCACTGA
GTGCTTTCTACTTTATGTCACGTAGTGCTTTCTACTTTATGggccgg 3'

-Brin anti-sens :

5'ccCATAAAGTAGAAAGCACTACGTGACATAAAGTAGAAAGCACTACAGTGCA
TAAAGTAGAAAGCACTACATCGCATAAAGTAGAAAGCACTACt 3'

CLONAGE DE LA SÉQUENCE CIBLE MIR 142T EN AVAL DE LA GFP

Le plasmide pGL3-promoter-vector dont le gène rapporteur est la firefly luciférase E176 (Promega) a été digéré par des enzymes de restriction pour remplacer le gène de la Luciférase par un autre gène rapporteur : la GFP (Green Fluorescent Protein) Le gène rapporteur a été intégré entre les sites NcoI et XbaI. La séquence complémentaire mir-142T a été intégrée au plasmide pGL3-GFP, dans la région 3' non traduite (UTR) en aval de la GFP, afin d'obtenir la construction pGL3-GFP.mir142T.

TRANSFECTION TRANSITOIRE D'ADN PLASMIDIQUE

La transfection d'ADN plasmidique est réalisée grâce au kit Jet PEI[®] (Polyplus transfection) utilisant le polyéthylèneimine (PEI). La transfection est réalisée lorsque les cellules sont à 50% - 80% de confluence.

MICROSCOPIE À FLUORESCENCE

Les cellules A549 sontensemencées sur lamelles de microscopie puis transfectées par les plasmides pGL3.GFP ou pGL3.GFP.mir-142T avec ou sans le plasmide d'expression du miARN 142 (pmir 142, CliniSciences) pour détecter la GFP au microscope à épifluorescence (Nikon).

Après 36 heures d'incubation, les cellules sont fixées par une solution à base de paraformaldéhyde (PFA).

Montage des lames : Une goutte de DAPI (qui colore les noyaux en se liant à l'ADN) est déposée sur chaque lame de microscope, préalablement identifiées et les lamelles sont déposées, les cellules étant du côté de la goutte. Les images sont traitées à l'aide du logiciel Image J.

Lignée cellulaire	mir 142 (Ct)	mir 26a (Ct)	let-7a (Ct)
A549	> 33	> 33	> 33
H460			
calu-6			
H358			
H1299			
H1650			
H1975			
HCC 827			
HCC 4006			
Tissu sain			
Poumon	23,8	26,4	24,6
Foie	22,9	23,4	25,1
Cellules sanguines	18,4	22,9	21,6

Tableau 5 : Valeurs de Ct (après amplification par PCR) mes miARN 142, 26a et let-7a dans 9 lignées tumorales pulmonaires humaines, du tissu sain, poumon sain, foie sain et cellules sanguines

Une valeur de Ct supérieur à 33 signifie que l'on ne détecte pas de miARN. La quantité de miARN dans les cellules ou le tissu est inversement proportionnelle à sa valeur de Ct.

RESULTATS

SÉLECTION DE MIARN DANS LA LITTÉRATURE

Une revue de la littérature nous a permis de sélectionner des miARN qui sont à la fois sous-exprimés dans les cellules tumorales pulmonaires et surexprimés dans les cellules des tissus sains (cellules pulmonaires, cellules hépatiques, cellules sanguines). Les miARN sélectionnés sont : mir 26a, mir 142-3p et let-7a (Yanaihara et al., 2006) (Tang et al., 2011).

Dans le détail, le mir 142 est très fortement exprimé dans les cellules sanguines tandis que le mir26a et let-7a font partie des dix miARN les plus exprimés dans les cellules pulmonaires saines ; et ils sont sous-exprimés dans les cellules tumorales (Sakurai et al., 2011).

EXPRESSION RELATIVE DES MIARN SÉLECTIONNÉS DANS LES TISSUS SAINS ET TUMORAUX

Pour confirmer les données de la littérature, nous avons vérifié les niveaux d'expression relative des miARN 142, 26a et let-7a dans neuf lignées tumorales pulmonaires : A549, H460, Calu-6, H358, H1299, H1650, H1975, HCC827, HCC4006. Parallèlement nous avons également regardé les niveaux d'expression dans des tissus sains : pulmonaires, hépatiques, hématopoïétiques.

Par qRT-PCR, nous pouvons voir que les trois miARN testés, mir 142, 26a et let-7a, ne sont exprimés dans aucune lignée tumorale pulmonaire testée (**tableau 5**) ; les cycles seuils des PCR (Ct) sont tous au-dessus de 33. En revanche, on peut mettre en évidence une expression des miARN sélectionnés dans les tissus sains. Les résultats montrent aussi des différences de niveau d'expression de ces miARN. Le mir 142 est le miARN le plus

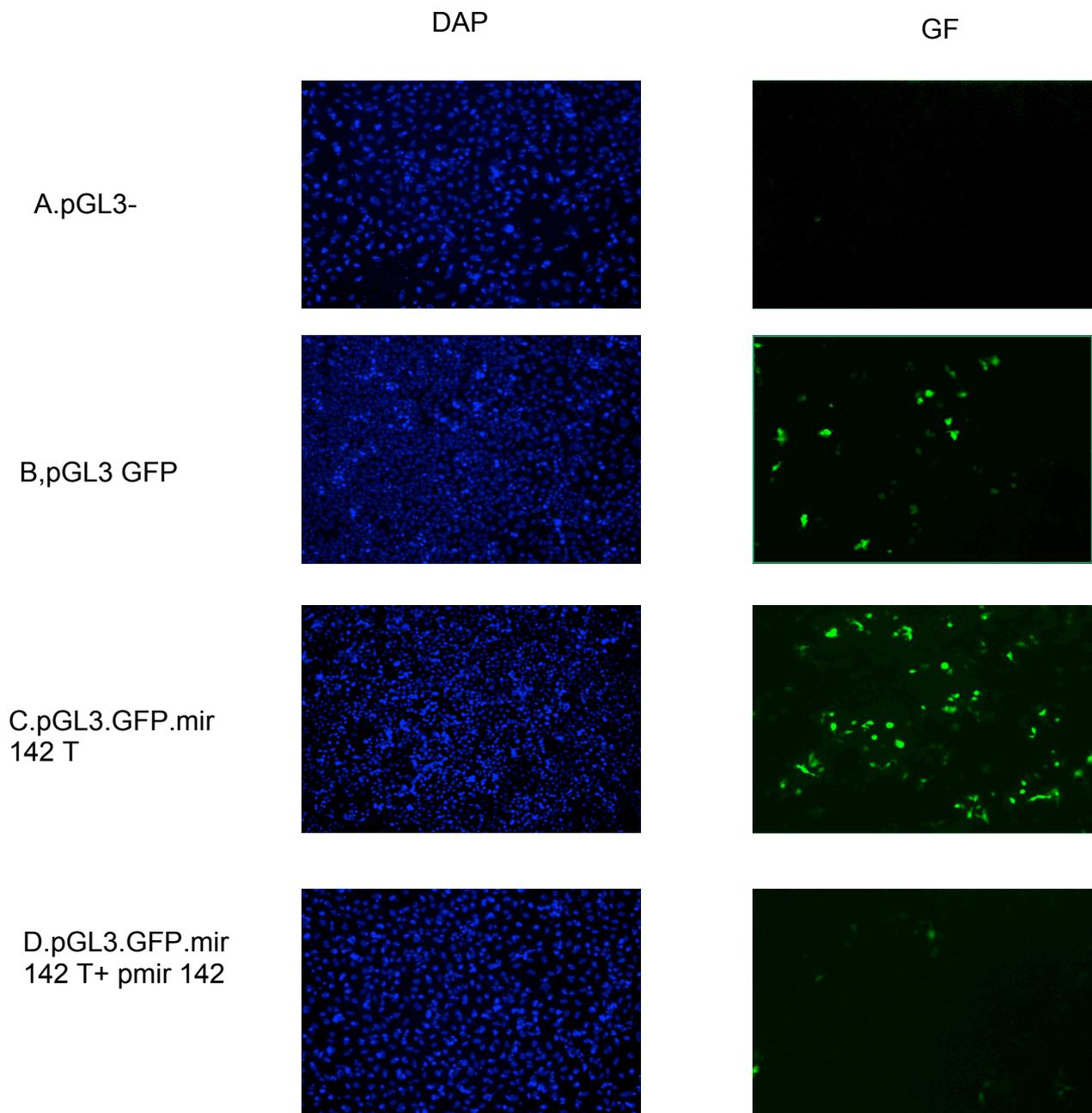


Figure 41 : Images d'épifluorescence des cellules A549 après transfection par PGL3-GFP et PGL3-GFP-mir142T avec ou sans pmir142

Les cellules A549 sont transfectées grâce au jet Pei. La coloration bleue correspond aux noyaux, elle est obtenue grâce au DAPI. La coloration verte correspond à la GFP.

(A) pGL3-luc ayant comme gène rapporteur la luciférase, non fluorescente, est utilisé comme témoin négatif.

(B) pGL3-GFP est utilisé comme témoin positif. (C) pGL3-GFP.mir142T sert également de témoin positif démontrant qu'il n'y a pas d'effet de l'insertion des séquences mir142T sur l'expression de la GFP. (D) Lorsque pGL3-GFP.mir142T est cotransfecté avec pmir 142, on observe une extinction du signal.

exprimé dans les tissus sains, il possède les Ct les plus faibles, et n'est pas exprimé dans les lignées tumorales.

Prenant en compte des résultats, nous décidons d'utiliser le mir 142 pour réaliser nos constructions plasmidiques.

EXPRESSION DE LA GFP APRÈS TRANSFECTION PLASMIDIQUE : VISUALISATION AU MICROSCOPE

Pour pouvoir visualiser l'efficacité de cette stratégie, nous avons transfecté les cellules A549 par les plasmides pGL3-Luc (témoin négatif), pGL3-GFP (témoin positif) et pGL3-GFP.mir142T avec ou sans le plasmide d'expression du mir 142 (pmir 142).

Nous observons (**Figure 41**), que le témoin négatif (A) n'émet pas de signal, alors que le témoin positif (B) émet une fluorescence verte correspondant à la GFP. Dans les cellules exprimant pGFP.mir142T (C), la GFP est également détectable (l'impression d'augmentation du signal est liée au choix du champ qui contenait plus de cellules que dans les autres conditions). Enfin nous observons une extinction du signal de la GFP (D) quand pmir 142 est surexprimé. L'expérience a été effectuée trois fois dans les mêmes conditions, et des résultats comparables ont été obtenus.

DISCUSSION

Ce travail a permis de démontrer l'efficacité des miARN dans le contrôle de l'expression d'un transgène. Dans une stratégie de GDEPT l'ajout de séquences cibles de miARN pourrait s'avérer intéressante afin d'empêcher l'expression du transgène dans des cellules non ciblées, limitant ainsi d'éventuelles toxicités secondaires.

Cette méthode s'est montrée efficace dans plusieurs modèles décrits dans la littérature (Brown et al., 2007a) (Suzuki et al., 2008). Un exemple nous intéresse particulièrement c'est

n°	type de tumeurs
1067	adénocarcinome invasif
1087	adénocarcinome invasif
113	adénocarcinome invasif
1267	carcinome épidermoïde
210	adénocarcinome invasif
260	adénocarcinome invasif
373	carcinome épidermoïde
401	adénocarcinome invasif
51	adénocarcinome invasif
647	adénocarcinome invasif

Tableau 6 : nature histologique des biopsies tumorales pulmonaires

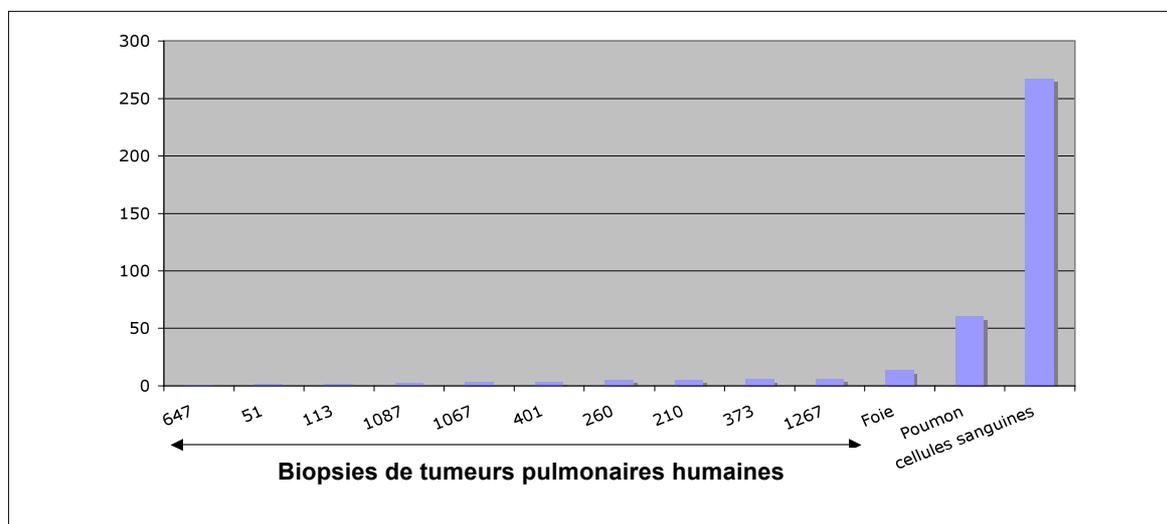


Figure 42 : Expression relative par rapport à une biopsie référence du miARN 142 dans des biopsies de tumeurs pulmonaires humaines et dans des tissus sains

l'étude de maladie de Crigler-Najjar dans un modèle animal de rat Gunn (Schmitt et al., 2010). Cette maladie se caractérise par une absence d'expression de l'UDP-glycosyltransférase 1 polypeptide A1 (UGT1A1) ce qui entraîne une hyper-bilirubinémie. Les chercheurs ont fait exprimer dans le foie des rats Gunn, à l'aide un lentivirus recombinant, le gène codant l'UGT1A1 afin de pallier l'absence de cette protéine dans la maladie. L'expression de ce gène permet de rétablir une bilirubinémie normale, mais il déclenche une réponse immunitaire contre la protéine codée par le transgène, entraînant une perte de l'expression du transgène dans le foie. L'hypothèse a alors été qu'une expression du transgène dans les cellules sanguines pouvait expliquer le déclenchement d'une réaction immunitaire dirigée contre le transgène.

Pour limiter l'expression du transgène au niveau hépatique seulement, et éviter l'expression dans les cellules sanguines, ils ont donc inséré quatre séquences cibles du mir 142 (fortement exprimé dans les cellules sanguines) dans la région 3'UTR du gène UGT1A1, inhibant l'expression du gène dans les cellules sanguines et empêchant le déclenchement d'une réaction immunitaire. Cette stratégie a permis d'observer une expression stable (6 mois) du gène UGT1A1 dans les cellules hépatiques et aucune réaction immunitaire dirigée contre le transgène.

Par la suite, nous avons eu accès à des biopsies de tumeurs pulmonaires (Pr. C. Badoual, Hôpital Européen Georges Pompidou) (**tableau 6**) dans lesquelles nous avons mesuré le taux d'expression de mir 142 (**figure 42**). Contrairement à ce que nous avons observé dans les lignées pulmonaires, nous avons détecté une faible expression de mir 142 dans ces biopsies (Ct environ 28-29). Cependant ce niveau d'expression était comparable à celui que

nous avons observé dans les cellules A549 transfectées par le plasmide pmir 142 et qui était suffisant pour empêcher l'expression de la GFP.

Au vu de ces résultats nous pensons que le mir 142 n'est donc pas le microARN idéal pour notre modèle expérimental. Nous avons choisi le mir 142 en fonction de son niveau d'expression dans des lignées tumorales pulmonaires humaines car celles-ci étaient disponibles au sein du laboratoire contrairement aux biopsies humaines qui sont plus difficiles à obtenir auprès des services d'anatomo-pathologie. Rétrospectivement, il aurait été plus judicieux de choisir le miARN en fonction de son expression dans les biopsies de tumeurs humaines. Il existe des puces d'expression des miRNA (Einat, 2006) (Yin et al., 2008) qui permettraient de cribler facilement l'expression des miRNA dans les biopsies pulmonaires humaines et dans les tissus sains pour choisir le ou les miRNA(s) les plus pertinents

Néanmoins la preuve de concept a bien été faite dans ce modèle, et pourrait permettre de s'affranchir d'une éventuelle expression de notre transgène en cas de dissémination hors des cellules tumorales

ANNEXE V : LES CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES COMME VECTEUR DE TRANSFERT

Ce travail a été réalisé avec Ikrame Amara que j'ai co-encadrée pendant son master 2 (M2 : janvier - juin 2013).

Aujourd'hui il n'existe pas encore de vecteur idéal en thérapie génique anticancéreuse capable de cibler spécifiquement la tumeur et limitant les toxicités indésirables. Les cellules souches mésenchymateuses représentent un outil intéressant dans le développement de nouvelles thérapies et notamment dans le domaine de la cancérologie du fait de leur propriété de tropisme tumoral. Nous nous sommes intéressés au développement de cellules souches mésenchymateuses comme outil de vectorisation de la GDEPT ; et dont voici les résultats préliminaires.

I LES CELLULES SOUCHES

I.1 DÉFINITION

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées qui sont caractérisées par leur capacité d'engendrer tout type de cellules spécialisées de l'organisme par différenciation cellulaire. Elles sont aussi caractérisées par leur capacité à se maintenir par prolifération, il s'agit du principe d'auto-renouvellement. Ainsi, pour qu'une cellule soit définie comme cellule souche, elle doit posséder ces deux propriétés : auto-renouvellement et différenciation. On retrouve ces cellules principalement, et en grand nombre, dans les tissus embryonnaires, le fœtus, le sang de cordon. Chez l'adulte, les cellules souches se

trouveront surtout au niveau de certains tissus, comme le tissu sanguin, le tissu osseux. Généralement les « cellules souches adultes » ont un potentiel de renouvellement et de différenciation faible par rapport aux cellules souches embryonnaires totipotentes.

Les cellules souches peuvent être divisées en 4 types principaux selon leur capacité de différenciation :

- **Cellules souches Totipotentes** : ces cellules sont capables de donner naissance à un organisme vivant entier. Elles sont issues du développement très précoce de l'embryon et peuvent se différencier en n'importe quel type cellulaire de l'organisme.
- **Cellules souches Pluripotentes** : contrairement aux cellules souches totipotentes, elles ne sont pas capables de donner un organisme vivant entier. Elles peuvent cependant se différencier en n'importe quelle cellule issue des trois feuillets embryonnaires primitifs (mésoderme, ectoderme, endoderme), y compris les cellules germinales.
- **Cellules souches Multipotentes** : il s'agit de cellules déjà engagées dans une voie de différenciation. Elles ne pourront donc donner qu'un nombre limité de types cellulaires différenciés issus d'un feuillet embryonnaire primitif.
- **Cellules souches Unipotentes** : ces cellules ne vont être capables de ne donner qu'un seul type de cellules différenciées. Elles sont considérées comme cellule souche car elles ont la propriété d'auto-renouvellement.

Ces cellules jouent un rôle clé durant les périodes de développement, dès le stade d'œuf, en permettant l'obtention de n'importe quel type cellulaire et ainsi n'importe quel tissu ou organe. L'implication des cellules souches ne s'arrête pas seulement au stade de

développement, puisqu'on les retrouve à l'âge adulte où elles seront impliquées dans de nombreux phénomènes physiologiques, d'homéostasie.

I.2 LES CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES

Parmi les différents types de cellules souches, les cellules souches mésenchymateuses appartiennent au sous-type des cellules souches multipotentes. Ces cellules ont été appelées ainsi pour la première fois en 1991 par Caplan. Avant cela, et aujourd'hui encore, elles sont aussi appelées CFU-F (colony Forming Units – Fibroblast) car elles ont été décrites comme cellules adhérentes, clonogéniques, non-phagocytaires et de type fibroblastique et possédant la capacité de donner naissance à des colonies fibroblastiques ; ou encore cellules stromales mésenchymateuses, du fait de leur soutien dans le développement du stroma (Caplan and Bruder, 2001). Leur découverte remonte, cependant, bien avant. Elles ont été décrites pour la première fois par Friedenstein et al. en 1971, comme cellules souches non-hématopoïétiques dans la moelle osseuse (Friedenstein and Kuralesova, 1971). La première purification de cellules souches mésenchymateuses a été réalisée grâce à leur capacité d'adhérence au plastique de culture. Cette technique est, aujourd'hui encore, utilisée pour isoler les MSC.

Ces cellules souches non hématopoïétiques présentes dans la moelle osseuse ont ensuite montré leur capacité à se différencier *in vitro* en différents types cellulaires issus du feuillet mésodermique : ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes. C'est la raison pour laquelle elles ont été appelées cellules souches mésenchymateuses.

On retrouve les cellules souches mésenchymateuses dans différents organes parmi lesquels poumon, muscle, tissu adipeux, moelle osseuse, sang, derme... (Zvaifler et al., 2000) (Gronthos et al., 2001) (Zuk et al., 2002) (Martin et al., 2008)

Les MSC présentent de nombreux antigènes mais ces marqueurs de surface ne sont pas spécifiques et sont retrouvés à la surface de cellules différenciées. Ces cellules souches mésenchymateuses ont ainsi une faible immunogénicité du fait, notamment, qu'elles n'expriment pas de marqueurs HLA de classe II (Pittenger and Martin, 2004).

Bien qu'elles ne soient pas immunogènes, ces cellules ont, en revanche, un effet immunosuppresseur, dose-dépendante, sur la prolifération des lymphocytes T. Ce phénomène serait dû à la libération de facteurs solubles (TGFβ1, interleukines) dans le microenvironnement par les cellules souches mésenchymateuses (Di Nicola et al., 2002). Elles possèdent en outre un tropisme particulier pour les sites inflammatoires et lésés mais plus particulièrement pour les tumeurs. Les MSC auront tendance à migrer suivant un gradient de chimiokines parmi lesquelles CXCL-12 (Brennen et al., 2013) (Jung et al., 2013). Cette propriété d'adressage vers un tissu lésé qui existe à l'état physiologique peut être mise à profit en thérapeutique pour avoir accès à des lésions, des tumeurs difficiles d'accès.

Sur l'ensemble des essais cliniques utilisant des cellules souches mésenchymateuses, 89,7% étaient issues de la moelle osseuse du patient, 5,6% du tissu adipeux et 4,7% d'un tissu placentaire (<http://clinicaltrials.gov/>).

Bien qu'elles soient limitées dans leur potentiel de prolifération et de différenciation par l'âge de l'individu chez lequel elles sont prélevées, les MSC sont des cellules immatures qui peuvent proliférer jusqu'à la quarantième génération (Bruder et al., 1997) (Fehrer and Lepperdinger, 2005).

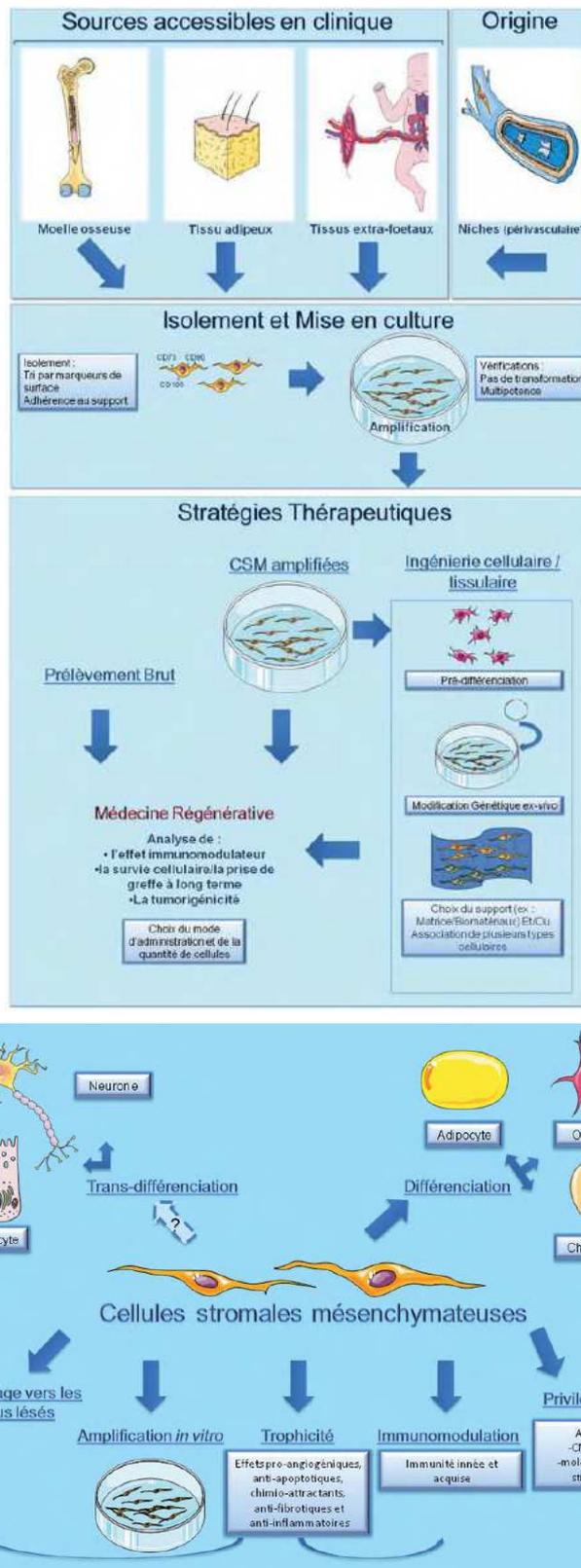


Figure 43 : Stratégies de prélèvement d'isolation et d'applications cliniques des cellules souches mésenchymateuse

(D'après Martinaud et al., 2010)

I.3 L'UTILISATION DE CELLULES SOUCHES EN THÉRAPIE

L'utilisation de cellules souches en thérapie se heurte à des problèmes éthiques du fait du prélèvement de cellules souches au niveau embryonnaire ou fœtal (**figure 43**). L'utilisation de cellules issues du sang de cordon ombilical est également problématique bien que celui-ci soit destiné à être éliminé.

Les protocoles ayant satisfait aux comités d'éthiques, se sont principalement tournés vers des applications de régénération ou de reconstruction (Kim and Cho, 2013). Les cellules souches mésenchymateuses représentent la majorité du sous-type de cellules souches, notamment du fait de la disponibilité. De nombreux exemples, de phase I, concernent des reconstructions osseuses ou de cartilages. Dans ces exemples les cellules souches sont issues de greffes allogéniques de moelle osseuse (Horwitz et al., 1999) (Horwitz et al., 2002) (Wakitani et al., 2002) (Wakitani et al., 2004) (Le Blanc et al., 2005) (Kuroda et al., 2007) (Wakitani et al., 2007) Dans ces études de phase I, les résultats ont été satisfaisants quelque soit le protocole puisqu'ils ont tous permis une amélioration des signes cliniques. D'autres exemples pour le traitement de l'infarctus du myocarde ont été entrepris avec des résultats encourageants (Chen et al., 2004) (Chen et al., 2006) (Katritsis et al., 2005) (Katritsis et al., 2007) (Yang et al., 2010). Des études ont également été menés sur des pathologies liées au système nerveux (Jiang et al., 2013)

I.4 L'UTILISATION DE CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES EN THÉRAPIE ANTITUMORALE

Les cellules souches mésenchymateuses sont de plus en plus étudiées comme vecteurs de thérapie en thérapie anticancéreuse. L'utilisation de ces cellules pour le ciblage des tumeurs s'explique par le tropisme des MSC pour ces dernières. La présence de cellules

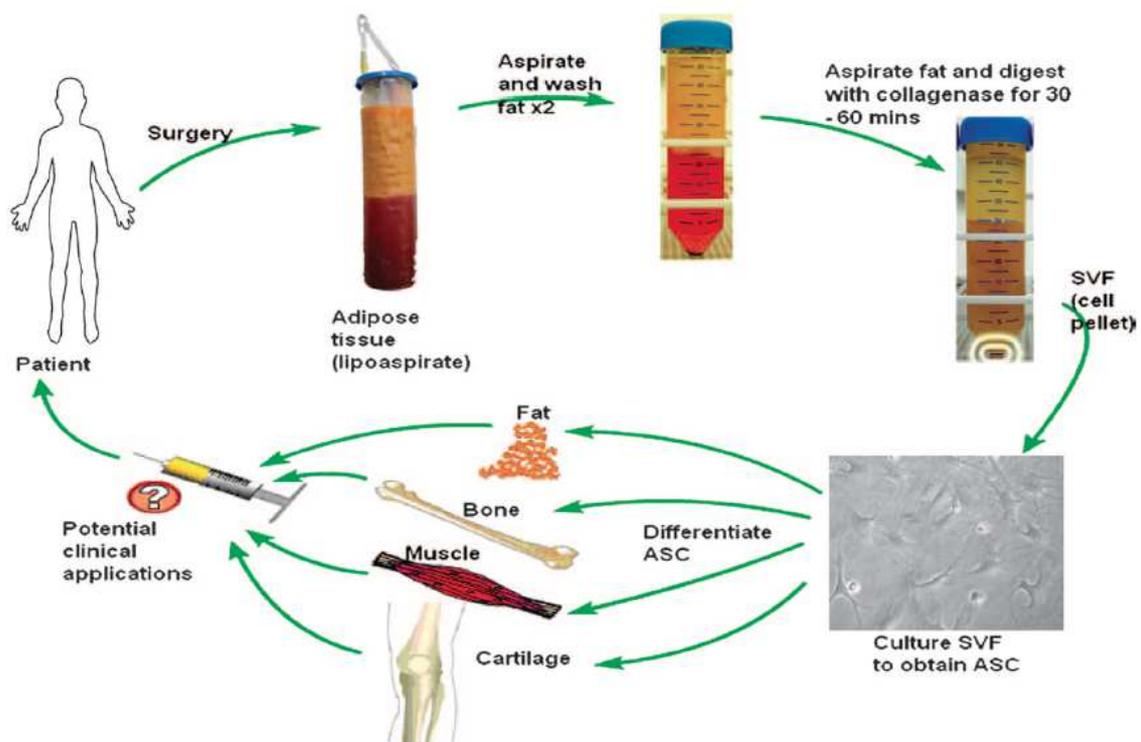


Figure 44 : Protocole de prélèvement et d'isolation de cellules souches mésoenchymateuses chez un patient à partir de tissu adipeux
(D'après Locke et al., 2009)

Du tissu adipeux du patient est prélevé par liposuccion. Les cellules sont ensuite centrifugées puis isolées en fonction du type cellulaire. Les cellules souches mésoenchymateuses sont récupérées puisensemencées pour être transformées ou différenciées en tissu. Les cellules pourront ensuite être réinjectées au patient pour l'application thérapeutique désirée.

souches mésenchymateuses dans le microenvironnement tumoral et la migration de MSC vers les foyers tumoraux (Song and Li, 2011) (Park et al., 2011) sont des propriétés utilisées pour cibler les tumeurs. Ainsi elles sont de plus en plus utilisées en GDEPT (**figure 44**).

PRÉSENTATION DU TRAVAIL

Une des limitations de la GDEPT réside dans le ciblage des cellules tumorales. L'utilisation de cellules souches mésenchymateuses capables de migrer au niveau des tumeurs représente donc une alternative intéressante aux vecteurs de transfert « classiques ».

Nous avons développé une stratégie basée sur l'utilisation de MSC exprimant notre gène de fusion CYP2B6TM-RED, après infection par un lentivirus recombinant. La première partie de ce travail a consisté à infecter les MSC de souris C57Bl/6 avec le LV-CYP2B6TM-RED, à vérifier les niveaux d'expression du transgène, puis la sensibilité de ces cellules transduites au CPA. Dans un deuxième temps, nous avons vérifié qu'en présence de cellules souches mésenchymateuses transduites et de CPA, les cellules tumorales TC1 mouraient du fait de la métabolisation du CPA par les MSC et de la diffusion des métabolites cytotoxiques dans les cellules TC1 (effet bystander). Pour cela, nous avons réalisé des co-cultures de cellules TC1 et MSC transduites que nous avons ensuite traitées au CPA.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

CULTURES CELLULAIRES

Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) de souris C57BL/6 (GIBCO), sont cultivées dans du milieu DMEM High glucose (GIBCO) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF), de la streptomycine (50 µg/mL), pénicilline (200 UI/mL) et fungizone (0,5 µg/mL) et du sodium pyruvate (1 mM).

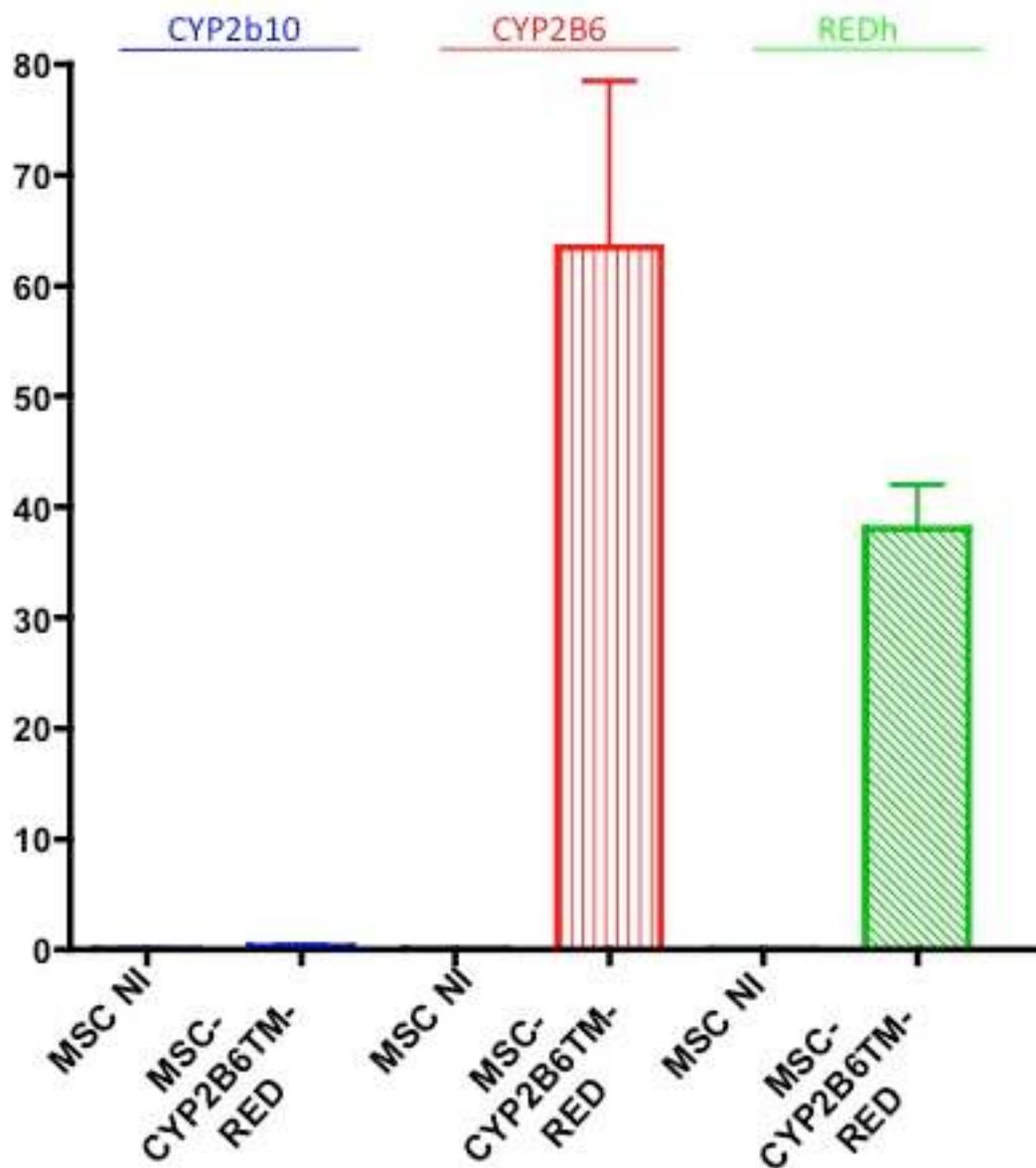


Figure 45 : Expression relative en ARNm ($2^{-\Delta C_t}$) CYP2B10, CYP2B6 et RED dans des cellules MSC NI (non infectées) et MSC CYP2B6TM-RED

Les résultats sont exprimés en $2^{-\Delta C_t}$ (ordonnés).

Les cellules TC1-Luc2, lignée tumorale pulmonaire issue de souris C57BL/6 exprimant la luciférase de manière stable, sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (L-glutamine) contenant 10% de sérum de veau fœtal, de la pénicilline (100 U/mL), streptomycine (100 µg/mL), du sodium pyruvate (1 mM) et du G418 (0,4 mg/mL, antibiotique de sélection).

Les cellules MSC et les TC1-Luc2 sont co-cultivées à différentes proportions (0% à 100%) dans du milieu DMEM High glucose.

INFECTION LENTIVIRALE

Les cellules sont infectées par un lentivirus (LV) CYP2B6TM-RED avec 200 particules infectieuses par cellule (MOI) durant 24 heures.

RÉSULTATS

EXPRESSION DU TRANSGÈNE CYP2B6TM-RED

L'expression de l'ARNm du transgène a été mesurée par RT-PCR en temps réel, sur des cellules souches mésenchymateuses infectées par le lentivirus recombinant LV CYP2B6TM-RED. Des cellules souches mésenchymateuses n'ayant pas été infectées (MSC NI ; non infectées) sont utilisées comme contrôles.

Les résultats montrent que les cellules non infectées n'expriment ni le CYP2B6, ni la RED. Au contraire on retrouve bien une expression de la protéine de fusion CYP2B6TM-RED dans les MSC qui ont été infectées par le LV CYP2B6TM-RED (**figure 45**).

Puisqu'il s'agit de cellules murines, nous avons vérifié les niveaux d'expression de la forme orthologue du CYP2B6 chez la souris : le Cyp2b10. Les résultats montrent que les cellules MSC murines n'expriment pas, non plus, de Cyp2b10.

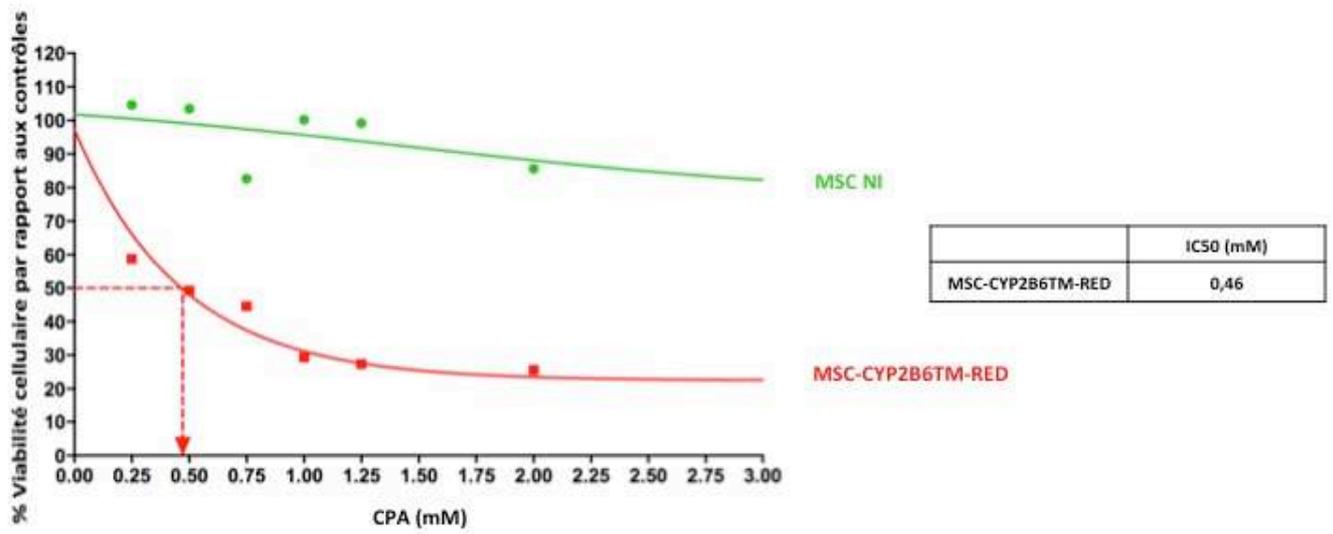


Figure 46 : Viabilité cellulaire de cellules MSC CYP2B6TM-RED traitées au CPA durant 3 jours et IC50

VIABILITÉ CELLULAIRE ET TEST DE CYTOTOXICITÉ APRÈS TRAITEMENT AU CPA

Après avoir fait exprimer la protéine de fusion CYP2B6TM-RED dans les cellules souches mésenchymateuses, nous avons voulu évaluer leur sensibilité au CPA. Pour cela, nous avons réalisé des tests de cytotoxicité MTS après traitement au cyclophosphamide. Les résultats des tests MTS mettent en évidence une bonne sensibilisation des cellules au CPA comparable aux cellules A549 ou TC1 (les IC₅₀ sont comparables, environ 0.5 mM) (cf figure A549) (**figure 46**).

CO-CULTURE MSC – TC1-LUC2 : ÉTUDE DE LA VIABILITÉ CELLULAIRE

Des cellules tumorales TC1-Luc2 ont été co-cultivées avec des cellules souches mésenchymateuses (MSC) exprimant la protéine de fusion CYP2B6TM-RED. Dans ces cultures les MSC représentent soit 100, 50, 25 ou 10% de l'ensemble des cellules (**figures 47, 48**). Lorsque l'on a 100% de cellules MSC CYP2B6TM-RED, on retrouve les résultats obtenus précédemment avec une très bonne sensibilisation des cellules au cyclophosphamide. On peut se rendre compte qu'en présence d'un mélange 50-50 de cellules MSC CYP2B6TM-RED et TC1-Luc2, on retrouve les mêmes résultats en termes de viabilité cellulaire par rapport à la condition où toutes les cellules MSC sont capables de métaboliser le CPA. De même, en présence de proportions plus faibles de MSC CYP2B6TM-RED, on retrouve toujours une mortalité cellulaire supérieure au pourcentage de cellules capables de métaboliser le CPA en métabolites cytotoxiques.

DISCUSSION

L'accessibilité des tumeurs est un impératif au succès de toute chimiothérapie. Dans le cas de thérapie génique, la difficulté d'accès aux tumeurs est synonyme d'incapacité d'utiliser

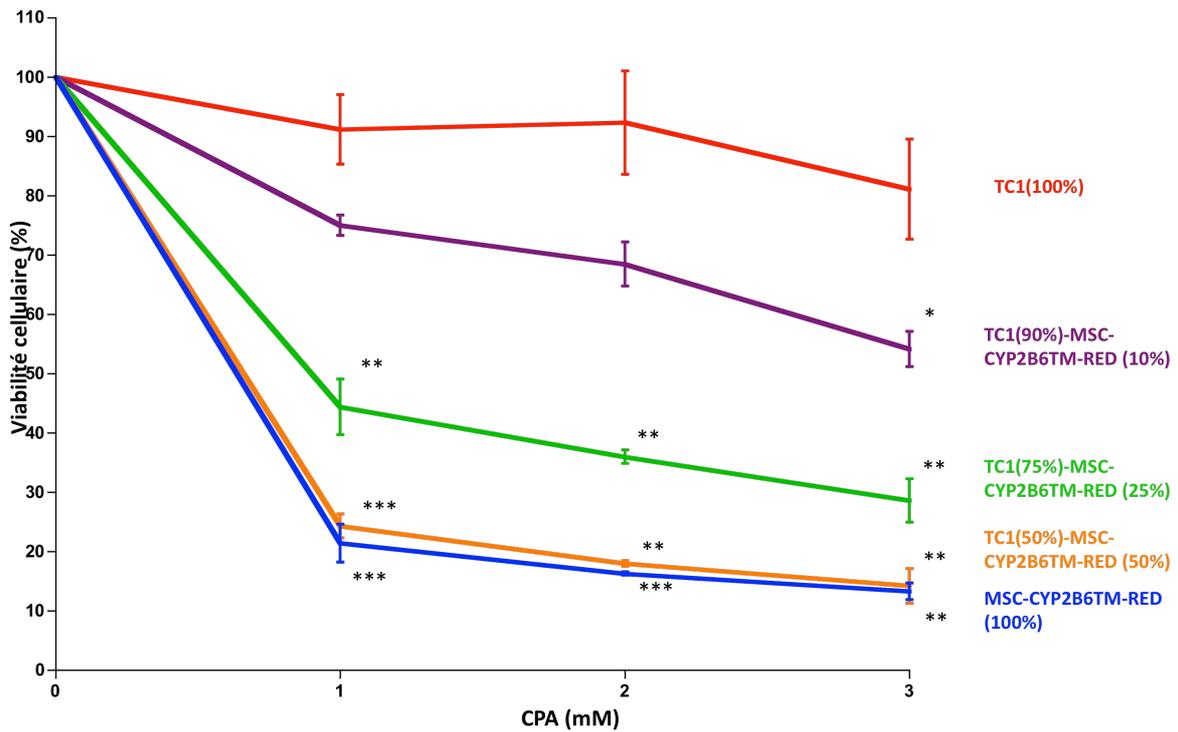


Figure 47 : Viabilité cellulaire de mélange cellulaire TC1 et MSC CYP2B6TM-RED

Les cellules sont traitées au CPA durant 3 jours

Rouge : TC1 (100%) ; Violet : TC1 (90%) + MSC CYP2B6TM-RED (10%) ; Vert : TC1 (75%) + MSC CYP2B6TM-RED (25%) ; Jaune : TC1 (50%) + MSC CYP2B6TM-RED (50%) ; Bleu : MSC CYP2B6TM-RED (100%)

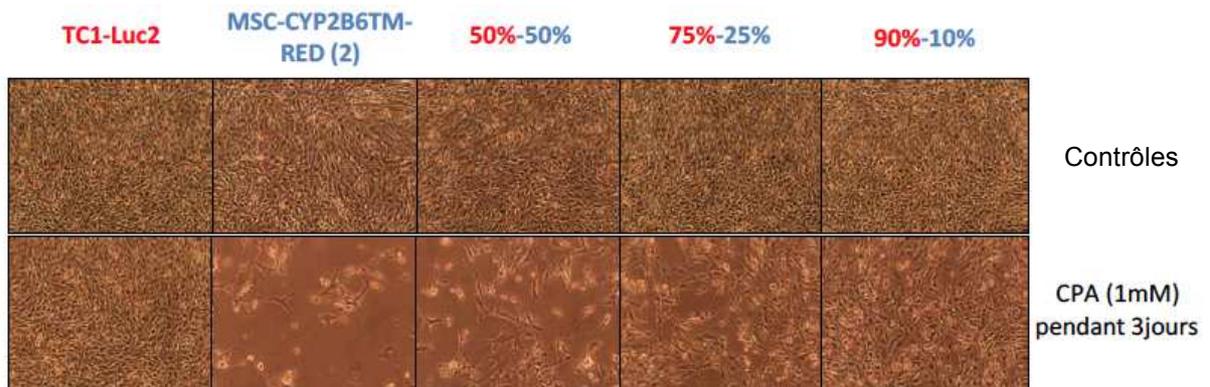


Figure 48 : Images microscopiques de mélanges de cellules TC1 et MSC CYP2B6TM-RED traitées au CPA (1 mM)

cette thérapie. Or, dans la plupart des cas les tumeurs se trouvent dans un environnement complexe entouré de tissus sains, ou alors disséminées en plusieurs points de l'organisme, lors de la présence de métastases. Les cellules souches mésenchymateuses ont la particularité d'être capables de migrer au niveau des foyers tumoraux et ainsi cibler les tumeurs où qu'elles soient dans l'organisme (Yang et al., 2012). Cette propriété peut alors être utilisée avec des cellules souches mésenchymateuses comme vecteur de transfert de gène (Lazennec, 2011). De récentes études *in vivo* ont montré que des cellules souches mésenchymateuses injectées à des souris ou des rats migrent vers le site tumoral (Kosaka et al., 2012)

Dans le cas de thérapie gène suicide, l'utilisation de cellules souches, exprimant une enzyme métabolisant une prodrogue anticancéreuse, se base sur les effets *bystander* et de diffusion passive des métabolites cytotoxiques (Matuskova et al., 2010) (Amano et al., 2011) (Li et al., 2012).

Les résultats *in vitro* des mélanges confirment le fait que les cellules souches mésenchymateuses au contact de cellules tumorales insensibles au CPA, sont capables de sensibiliser ces dernières. De plus en plus d'études montrent l'efficacité de GDEPT vectorisées par MSC (Dwyer et al., 2010) (Amano et al., 2011) (Kosaka et al., 2012) (Altaner and Altanero, 2012) (Li et al., 2012).

L'étude du tropisme et des mécanismes mis en jeu est un préalable indispensable. Bien que des hypothèses ont été émises pour expliquer en détail les raisons pour lesquelles les MSC migrent vers les tumeurs, il reste de nombreuses questions en suspens (Doucette et al., 2011) (Hu et al., 2012). La meilleure façon de se rapprocher de la réalité et de la complexité du microenvironnement tumoral consiste à faire faire des tumeurs orthotopiques aux souris. Nous avons prévu d'injecter des cellules tumorales TC1 directement dans les poumons de

souris C57Bl/6 afin qu'elles aient des tumeurs pulmonaires. L'étude du tropisme pourra être réalisée en utilisant des cellules souches mésenchymateuses exprimant la luciférase, que l'on pourra suivre *in vivo* par bioluminescence.

L'utilisation de cellules souches en thérapie anticancéreuse peut inquiéter, en raison de leur implication dans la cancérogenèse, le développement de résistances aux thérapeutiques et l'échec thérapeutique (Mandel et al., 2013) (Gomes, 2013). Un des avantages de cette technique réside dans le fait que les MSC en exprimant le CYP2B6TM-RED représentent la première cible du traitement CPA. Cette sécurité permet d'éviter toute dissémination des cellules hors de leur cible tumoral ou développement d'une nouvelle tumeur, en les neutralisant par l'administration de la prodrogue.

Pour éviter tout risque de dissémination hors de la cible, toutes les cellules souches mésenchymateuses devront exprimer la protéine CYP2B6TM-RED. C'est pourquoi dans les expériences qui seront menées prochainement, seules des cellules dont on est sûr qu'elles expriment le CYP2B6TM-RED seront utilisées. Des clonages sont actuellement réalisés, par dilution limite, pour sélectionner les MSC CYP2B6TM-RED.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adotevi, O., Pere, H., Ravel, P., Haicheur, N., Badoual, C., Merillon, N., Medioni, J., Peyrard, S., Roncelin, S., Verkarre, V., *et al.* (2010). A decrease of regulatory T cells correlates with overall survival after sunitinib-based antiangiogenic therapy in metastatic renal cancer patients. *J Immunother* 33, 991-998.
- Agard, C., Ligeza, C., Dupas, B., Izembart, A., El Kouri, C., Moullier, P., and Ferry, N. (2001). Immune-dependent distant bystander effect after adenovirus-mediated suicide gene transfer in a rat model of liver colorectal metastasis. *Cancer gene therapy* 8, 128-136.
- Ahi, Y.S., Bangari, D.S., and Mittal, S.K. (2011). Adenoviral vector immunity: its implications and circumvention strategies. *Current gene therapy* 11, 307-320.
- Alba, R., Bosch, A., and Chillon, M. (2005). Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene therapy* 12 *Suppl 1*, S18-27.
- Aleman, R. (2012). Chapter four--Design of improved oncolytic adenoviruses. *Advances in cancer research* 115, 93-114.
- Aleman, R. (2013). Viruses in cancer treatment. *Clinical & translational oncology* : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico 15, 182-188.
- Altaner, C., and Altanerova, V. (2012). Stem cell based glioblastoma gene therapy. *Neoplasma* 59, 756-760.
- Altaras, N.E., Aunins, J.G., Evans, R.K., Kamen, A., Konz, J.O., and Wolf, J.J. (2005). Production and formulation of adenovirus vectors. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 99, 193-260.
- Amano, S., Gu, C., Koizumi, S., Tokuyama, T., and Namba, H. (2011). Tumoricidal bystander effect in the suicide gene therapy using mesenchymal stem cells does not injure normal brain tissues. *Cancer letters* 306, 99-105.
- Anlezark, G.M., Melton, R.G., Sherwood, R.F., Coles, B., Friedlos, F., and Knox, R.J. (1992). The bioactivation of 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954)--I. Purification and properties of a nitroreductase enzyme from *Escherichia coli*--a potential enzyme for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). *Biochemical pharmacology* 44, 2289-2295.
- Aparicio, S., and Caldas, C. (2013). The implications of clonal genome evolution for cancer medicine. *The New England journal of medicine* 368, 842-851.

Ardiani, A., Sanchez-Bonilla, M., and Black, M.E. (2010). Fusion enzymes containing HSV-1 thymidine kinase mutants and guanylate kinase enhance prodrug sensitivity in vitro and in vivo. *Cancer gene therapy* *17*, 86-96.

Argos, P. (1990). An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion. *Journal of molecular biology* *211*, 943-958.

Ayala, G., Satoh, T., Li, R., Shalev, M., Gdor, Y., Aguilar-Cordova, E., Frolov, A., Wheeler, T.M., Miles, B.J., Rauen, K., *et al.* (2006). Biological response determinants in HSV-tk + ganciclovir gene therapy for prostate cancer. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* *13*, 716-728.

Ayuso, E., Mingozi, F., and Bosch, F. (2010). Production, purification and characterization of adeno-associated vectors. *Current gene therapy* *10*, 423-436.

Banasik, M.B., and McCray, P.B., Jr. (2010). Integrase-defective lentiviral vectors: progress and applications. *Gene therapy* *17*, 150-157.

Barba, D., Hardin, J., Sadelain, M., and Gage, F.H. (1994). Development of anti-tumor immunity following thymidine kinase-mediated killing of experimental brain tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 4348-4352.

Barbon, C.M., Yang, M., Wands, G.D., Ramesh, R., Slusher, B.S., Hedley, M.L., and Luby, T.M. (2010). Consecutive low doses of cyclophosphamide preferentially target Tregs and potentiate T cell responses induced by DNA PLG microparticle immunization. *Cellular immunology* *262*, 150-161.

Barzon, L., Pacenti, M., Franchin, E., Colombo, F., and Palu, G. (2009). HSV-TK/IL-2 gene therapy for glioblastoma multiforme. *Methods Mol Biol* *542*, 529-549.

Basile, K.J., and Aplin, A.E. (2012). Resistance to chemotherapy: short-term drug tolerance and stem cell-like subpopulations. *Adv Pharmacol* *65*, 315-334.

Beaune, P. (1993). [Human cytochromes P450. Applications in pharmacology]. *Therapie* *48*, 521-526.

Bergelson, J.M. (1999). Receptors mediating adenovirus attachment and internalization. *Biochemical pharmacology* *57*, 975-979.

Bi, W.L., Parysek, L.M., Warnick, R., and Stambrook, P.J. (1993). In vitro evidence that metabolic cooperation is responsible for the bystander effect observed with HSV tk retroviral gene therapy. *Human gene therapy* *4*, 725-731.

Biasco, L., Baricordi, C., and Aiuti, A. (2012). Retroviral integrations in gene therapy trials. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* *20*, 709-716.

Biffi, A., Aubourg, P., and Cartier, N. (2011). Gene therapy for leukodystrophies. *Human molecular genetics* 20, R42-53.

Black, M.E. (2001). Enzyme and pathway engineering for suicide gene therapy. *Genetic engineering* 23, 113-127.

Blaese, R.M., Culver, K.W., Miller, A.D., Carter, C.S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., *et al.* (1995). T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270, 475-480.

Boland, M.P., Knox, R.J., and Roberts, J.J. (1991). The differences in kinetics of rat and human DT diaphorase result in a differential sensitivity of derived cell lines to CB 1954 (5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide). *Biochemical pharmacology* 41, 867-875.

Bongers, M.L., Coupe, V.M., Jansma, E.P., Smit, E.F., and Uyl-de Groot, C.A. (2012). Cost effectiveness of treatment with new agents in advanced non-small-cell lung cancer: a systematic review. *Pharmacoeconomics* 30, 17-34.

Boven, E., Venema-Gaberscek, E., Erkelens, C.A., Bissery, M.C., and Pinedo, H.M. (1993). Antitumor activity of taxotere (RP 56976, NSC 628503), a new taxol analog, in experimental ovarian cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 4, 321-324.

Braghiroli, M.I., Sabbaga, J., and Hoff, P.M. (2012). Bevacizumab: overview of the literature. *Expert review of anticancer therapy* 12, 567-580.

Braybrooke, J.P., Slade, A., Deplanque, G., Harrop, R., Madhusudan, S., Forster, M.D., Gibson, R., Makris, A., Talbot, D.C., Steiner, J., *et al.* (2005). Phase I study of MetXia-P450 gene therapy and oral cyclophosphamide for patients with advanced breast cancer or melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11, 1512-1520.

Brennen, W.N., Chen, S., Denmeade, S.R., and Isaacs, J.T. (2013). Quantification of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) at sites of human prostate cancer. *Oncotarget* 4, 106-117.

Brown, B.D., Cantore, A., Annoni, A., Sergi, L.S., Lombardo, A., Della Valle, P., D'Angelo, A., and Naldini, L. (2007a). A microRNA-regulated lentiviral vector mediates stable correction of hemophilia B mice. *Blood* 110, 4144-4152.

Brown, B.D., Gentner, B., Cantore, A., Colleoni, S., Amendola, M., Zingale, A., Baccharini, A., Lazzari, G., Galli, C., and Naldini, L. (2007b). Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state. *Nature biotechnology* 25, 1457-1467.

Bruder, S.P., Jaiswal, N., and Haynesworth, S.E. (1997). Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *Journal of cellular biochemistry* 64, 278-294.

Bruzzone, R., White, T.W., and Paul, D.L. (1996). Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *European journal of biochemistry / FEBS* 238, 1-27.

Caplan, A.I., and Bruder, S.P. (2001). Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends in molecular medicine* 7, 259-264.

Carballido, E., and Fishman, M. (2011). Sipuleucel-T: Prototype for development of anti-tumor vaccines. *Current oncology reports* 13, 112-119.

Carette, D., Gilleron, J., Decrouy, X., Fiorini, C., Diry, M., Segretain, D., and Pointis, G. (2009). Connexin 33 impairs gap junction functionality by accelerating connexin 43 gap junction plaque endocytosis. *Traffic* 10, 1272-1285.

Carmen, I.H. (2001). A death in the laboratory: the politics of the Gelsinger aftermath. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 3, 425-428.

Cartier, N., and Aubourg, P. (2010). Hematopoietic stem cell transplantation and hematopoietic stem cell gene therapy in X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain Pathol* 20, 857-862.

Cartier, N., Hacein-Bey-Abina, S., Bartholomae, C.C., Veres, G., Schmidt, M., Kutschera, I., Vidaud, M., Abel, U., Dal-Cortivo, L., Caccavelli, L., *et al.* (2009). Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* 326, 818-823.

Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J.L., *et al.* (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288, 669-672.

Chang, T.K., Weber, G.F., Crespi, C.L., and Waxman, D.J. (1993). Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochromes P-450 2B and 3A in human liver microsomes. *Cancer research* 53, 5629-5637.

Chen, C.S., Jounaidi, Y., Su, T., and Waxman, D.J. (2007). Enhancement of intratumoral cyclophosphamide pharmacokinetics and antitumor activity in a P450 2B11-based cancer gene therapy model. *Cancer gene therapy* 14, 935-944.

Chen, L., and Waxman, D.J. (1995). Intratumoral activation and enhanced chemotherapeutic effect of oxazaphosphorines following cytochrome P-450 gene transfer: development of a combined chemotherapy/cancer gene therapy strategy. *Cancer research* 55, 581-589.

Chen, L., Waxman, D.J., Chen, D., and Kufe, D.W. (1996). Sensitization of human breast cancer cells to cyclophosphamide and ifosfamide by transfer of a liver cytochrome P450 gene. *Cancer research* 56, 1331-1340.

Chen, S., Liu, Z., Tian, N., Zhang, J., Yei, F., Duan, B., Zhu, Z., Lin, S., and Kwan, T.W. (2006). Intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells

for ischemic cardiomyopathy due to isolated chronic occluded left anterior descending artery. *The Journal of invasive cardiology* 18, 552-556.

Chen, S.L., Fang, W.W., Ye, F., Liu, Y.H., Qian, J., Shan, S.J., Zhang, J.J., Chunhua, R.Z., Liao, L.M., Lin, S., *et al.* (2004). Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *The American journal of cardiology* 94, 92-95.

Chevez-Barrios, P., Chintagumpala, M., Mieler, W., Paysse, E., Boniuk, M., Kozinetz, C., Hurwitz, M.Y., and Hurwitz, R.L. (2005). Response of retinoblastoma with vitreous tumor seeding to adenovirus-mediated delivery of thymidine kinase followed by ganciclovir. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23, 7927-7935.

Chuah, M.K., Nair, N., and VandenDriessche, T. (2012). Recent progress in gene therapy for hemophilia. *Human gene therapy* 23, 557-565.

Clarke, L., and Waxman, D.J. (1989). Oxidative metabolism of cyclophosphamide: identification of the hepatic monooxygenase catalysts of drug activation. *Cancer research* 49, 2344-2350.

Colle, M.A., Piguet, F., Bertrand, L., Raoul, S., Bieche, I., Dubreil, L., Sloothak, D., Bouquet, C., Moullier, P., Aubourg, P., *et al.* (2010). Efficient intracerebral delivery of AAV5 vector encoding human ARSA in non-human primate. *Human molecular genetics* 19, 147-158.

Cottin, S., Ghani, K., de Campos-Lima, P.O., and Caruso, M. (2010). Gemcitabine intercellular diffusion mediated by gap junctions: new implications for cancer therapy. *Molecular cancer* 9, 141.

Cronier, L., Crespin, S., Strale, P.O., Defamie, N., and Mesnil, M. (2009). Gap junctions and cancer: new functions for an old story. *Antioxidants & redox signaling* 11, 323-338.

Crystal, R.G., Hirschowitz, E., Lieberman, M., Daly, J., Kazam, E., Henschke, C., Yankelevitz, D., Kemeny, N., Silverstein, R., Ohwada, A., *et al.* (1997). Phase I study of direct administration of a replication deficient adenovirus vector containing the E. coli cytosine deaminase gene to metastatic colon carcinoma of the liver in association with the oral administration of the pro-drug 5-fluorocytosine. *Human gene therapy* 8, 985-1001.

Cunningham, C., and Nemunaitis, J. (2001). A phase I trial of genetically modified *Salmonella typhimurium* expressing cytosine deaminase (TAPET-CD, VNP20029) administered by intratumoral injection in combination with 5-fluorocytosine for patients with advanced or metastatic cancer. Protocol no: CL-017. Version: April 9, 2001. *Human gene therapy* 12, 1594-1596.

Czerwinski, M., McLemore, T.L., Gelboin, H.V., and Gonzalez, F.J. (1994). Quantification of CYP2B7, CYP4B1, and CYPOR messenger RNAs in normal human lung and lung tumors. *Cancer research* 54, 1085-1091.

Dalba, C., Bellier, B., Kasahara, N., and Klatzmann, D. (2007). Replication-competent vectors and empty virus-like particles: new retroviral vector designs for cancer gene therapy or vaccines. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* *15*, 457-466.

de Rezende, L.C., Silva, I.V., Rangel, L.B., and Guimaraes, M.C. (2010). Regulatory T cell as a target for cancer therapy. *Archivum immunologiae et therapeutiae experimentalis* *58*, 179-190.

Del Mastro, L., Lambertini, M., Bighin, C., Levaggi, A., D'Alonzo, A., Giraudi, S., and Pronzato, P. (2012). Trastuzumab as first-line therapy in HER2-positive metastatic breast cancer patients. *Expert review of anticancer therapy* *12*, 1391-1405.

Denny, W.A., and Baguley, B.C. (2003). Dual topoisomerase I/II inhibitors in cancer therapy. *Current topics in medicinal chemistry* *3*, 339-353.

DeVita, V.T., Jr., and Chu, E. (2008). A history of cancer chemotherapy. *Cancer research* *68*, 8643-8653.

Deyle, D.R., and Russell, D.W. (2009). Adeno-associated virus vector integration. *Current opinion in molecular therapeutics* *11*, 442-447.

Dhodapkar, M.V. (2013). Personalized immune-interception of cancer and the battle of two adaptive systems--when is the time right? *Cancer Prev Res (Phila)* *6*, 173-176.

Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P.D., Matteucci, P., Grisanti, S., and Gianni, A.M. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* *99*, 3838-3843.

Diaz, L.A., Jr., Williams, R.T., Wu, J., Kinde, I., Hecht, J.R., Berlin, J., Allen, B., Bozic, I., Reiter, J.G., Nowak, M.A., *et al.* (2012). The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* *486*, 537-540.

Doench, J.G., Petersen, C.P., and Sharp, P.A. (2003). siRNAs can function as miRNAs. *Genes & development* *17*, 438-442.

Doucette, T., Rao, G., Yang, Y., Gumin, J., Shinojima, N., Bekele, B.N., Qiao, W., Zhang, W., and Lang, F.F. (2011). Mesenchymal stem cells display tumor-specific tropism in an RCAS/Ntv-a glioma model. *Neoplasia* *13*, 716-725.

Dwyer, R.M., Khan, S., Barry, F.P., O'Brien, T., and Kerin, M.J. (2010). Advances in mesenchymal stem cell-mediated gene therapy for cancer. *Stem cell research & therapy* *1*, 25.

Dyall, J., Szabo, P., and Berns, K.I. (1999). Adeno-associated virus (AAV) site-specific integration: formation of AAV-AAVS1 junctions in an in vitro system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 12849-12854.

Einat, P. (2006). Methodologies for high-throughput expression profiling of microRNAs. *Methods Mol Biol* 342, 139-157.

Ekhart, C., Doodeman, V.D., Rodenhuis, S., Smits, P.H., Beijnen, J.H., and Huitema, A.D. (2008). Influence of polymorphisms of drug metabolizing enzymes (CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, GSTA1, GSTP1, ALDH1A1 and ALDH3A1) on the pharmacokinetics of cyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide. *Pharmacogenetics and genomics* 18, 515-523.

Ekins, S., Iyer, M., Krasowski, M.D., and Kharasch, E.D. (2008). Molecular characterization of CYP2B6 substrates. *Current drug metabolism* 9, 363-373.

El Maalouf, G., Le Tourneau, C., Batty, G.N., Faivre, S., and Raymond, E. (2009). Markers involved in resistance to cytotoxics and targeted therapeutics in pancreatic cancer. *Cancer treatment reviews* 35, 167-174.

Elion, G.B., Singer, S., and Hitchings, G.H. (1954). Antagonists of nucleic acid derivatives. VIII. Synergism in combinations of biochemically related antimetabolites. *The Journal of biological chemistry* 208, 477-488.

Elshami, A.A., Saavedra, A., Zhang, H., Kucharczuk, J.C., Spray, D.C., Fishman, G.I., Amin, K.M., Kaiser, L.R., and Albelda, S.M. (1996). Gap junctions play a role in the 'bystander effect' of the herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system in vitro. *Gene therapy* 3, 85-92.

Emadi, A., Jones, R.J., and Brodsky, R.A. (2009). Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nature reviews Clinical oncology* 6, 638-647.

Erdman, D.D., Xu, W., Gerber, S.I., Gray, G.C., Schnurr, D., Kajon, A.E., and Anderson, L.J. (2002). Molecular epidemiology of adenovirus type 7 in the United States, 1966-2000. *Emerging infectious diseases* 8, 269-277.

Fehrer, C., and Lepperdinger, G. (2005). Mesenchymal stem cell aging. *Experimental gerontology* 40, 926-930.

Ferrusi, I.L., Leighl, N.B., Kulin, N.A., and Marshall, D.A. (2011). Do economic evaluations of targeted therapy provide support for decision makers? *The American journal of managed care* 17 Suppl 5 *Developing*, SP61-70.

Fick, J., Barker, F.G., 2nd, Dazin, P., Westphale, E.M., Beyer, E.C., and Israel, M.A. (1995). The extent of heterocellular communication mediated by gap junctions is predictive of bystander tumor cytotoxicity in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 11071-11075.

Fillat, C., Carrio, M., Cascante, A., and Sangro, B. (2003). Suicide gene therapy mediated by the Herpes Simplex virus thymidine kinase gene/Ganciclovir system: fifteen years of application. *Current gene therapy* 3, 13-26.

Fiorini, C., Gilleron, J., Carette, D., Valette, A., Tilloy, A., Chevalier, S., Segretain, D., and Pointis, G. (2008). Accelerated internalization of junctional membrane proteins (connexin 43, N-cadherin and ZO-1) within endocytic vacuoles: an early event of DDT carcinogenicity. *Biochimica et biophysica acta* 1778, 56-67.

Fitzsimmons, S.A., Workman, P., Grever, M., Paull, K., Camalier, R., and Lewis, A.D. (1996). Reductase enzyme expression across the National Cancer Institute Tumor cell line panel: correlation with sensitivity to mitomycin C and EO9. *Journal of the National Cancer Institute* 88, 259-269.

Friedenstein, A., and Kuralesova, A.I. (1971). Osteogenic precursor cells of bone marrow in radiation chimeras. *Transplantation* 12, 99-108.

Friedlos, F., Court, S., Ford, M., Denny, W.A., and Springer, C. (1998). Gene-directed enzyme prodrug therapy: quantitative bystander cytotoxicity and DNA damage induced by CB1954 in cells expressing bacterial nitroreductase. *Gene therapy* 5, 105-112.

Fuertes, M.A., Castilla, J., Alonso, C., and Perez, J.M. (2003). Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. *Current medicinal chemistry* 10, 257-266.

Gabriel, R., Schmidt, M., and von Kalle, C. (2012). Integration of retroviral vectors. *Current opinion in immunology* 24, 592-597.

Gagandeep, S., Brew, R., Green, B., Christmas, S.E., Klatzmann, D., Poston, G.J., and Kinsella, A.R. (1996). Prodrug-activated gene therapy: involvement of an immunological component in the "bystander effect". *Cancer gene therapy* 3, 83-88.

Galmarini, C.M., Mackey, J.R., and Dumontet, C. (2002). Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. *The lancet oncology* 3, 415-424.

Garg, A.D., Krysko, D.V., Verfaillie, T., Kaczmarek, A., Ferreira, G.B., Marysael, T., Rubio, N., Firczuk, M., Mathieu, C., Roebroek, A.J., *et al.* (2012). A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *The EMBO journal* 31, 1062-1079.

Gay, S.C., Shah, M.B., Talakad, J.C., Maekawa, K., Roberts, A.G., Wilderman, P.R., Sun, L., Yang, J.Y., Huelga, S.C., Hong, W.X., *et al.* (2010). Crystal structure of a cytochrome P450 2B6 genetic variant in complex with the inhibitor 4-(4-chlorophenyl)imidazole at 2.0-Å resolution. *Molecular pharmacology* 77, 529-538.

Ge, J., Tian, A.X., Wang, Q.S., Kong, P.Z., Yu, Y., Li, X.Q., Cao, X.C., and Feng, Y.M. (2013). The GSTP1 105Val Allele Increases Breast Cancer Risk and Aggressiveness but Enhances Response to Cyclophosphamide Chemotherapy in North China. *PloS one* 8, e67589.

Geary, S.M., Lemke, C.D., Lubaroff, D.M., and Salem, A.K. (2013). Proposed mechanisms of action for prostate cancer vaccines. *Nature reviews Urology* 10, 149-160.

Germano, I.M., Fable, J., Gultekin, S.H., and Silvers, A. (2003). Adenovirus/herpes simplex-thymidine kinase/ganciclovir complex: preliminary results of a phase I trial in patients with recurrent malignant gliomas. *Journal of neuro-oncology* 65, 279-289.

Gervot, L., Rochat, B., Gautier, J.C., Bohnenstengel, F., Kroemer, H., de Berardinis, V., Martin, H., Beaune, P., and de Waziers, I. (1999). Human CYP2B6: expression, inducibility and catalytic activities. *Pharmacogenetics* 9, 295-306.

Ghiaur, G., Gerber, J.M., Matsui, W., and Jones, R.J. (2012). Cancer stem cells: relevance to clinical transplantation. *Current opinion in oncology* 24, 170-175.

Gilman, A. (1946). Therapeutic applications of chemical warfare agents. *Federation proceedings* 5, 285-292.

Giraud, B., Hebert, G., Deroussent, A., Veal, G.J., Vassal, G., and Paci, A. (2010). Oxazaphosphorines: new therapeutic strategies for an old class of drugs. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 6, 919-938.

Goldberg, G., and Bertram, J.S. (1994). Re: Z. Ram et al., In situ retroviral-mediated gene transfer for the treatment of brain tumors in rats. *Cancer Res.*, 53: 83-88, 1993. *Cancer research* 54, 3947-3948.

Gomes, C.M. (2013). The dual role of mesenchymal stem cells in tumor progression. *Stem cell research & therapy* 4, 42.

Gomez-Lechon, M.J., Donato, T., Jover, R., Rodriguez, C., Ponsoda, X., Glaise, D., Castell, J.V., and Guguen-Guillouzo, C. (2001). Expression and induction of a large set of drug-metabolizing enzymes by the highly differentiated human hepatoma cell line BC2. *European journal of biochemistry / FEBS* 268, 1448-1459.

Goodenough, D.A., and Paul, D.L. (2009). Gap junctions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1, a002576.

Goodman, L.S., Wintrobe, M.M., and et al. (1946). Nitrogen mustard therapy; use of methyl-bis (beta-chloroethyl) amine hydrochloride and tris (beta-chloroethyl) amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. *Journal of the American Medical Association* 132, 126-132.

Gronthos, S., Franklin, D.M., Leddy, H.A., Robey, P.G., Storms, R.W., and Gimble, J.M. (2001). Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *Journal of cellular physiology* 189, 54-63.

Guan, Y.S., Liu, Y., Zou, Q., He, Q., La, Z., Yang, L., and Hu, Y. (2009). Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in combination with bronchial arterial infusion for treatment of advanced non-small-cell lung cancer, one year follow-up. *Journal of Zhejiang University Science B* 10, 331-340.

Gui, T., and Shen, K. (2012). The epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in epithelial ovarian cancer. *Cancer epidemiology* 36, 490-496.

Gunther, M., Waxman, D.J., Wagner, E., and Ogris, M. (2006). Effects of hypoxia and limited diffusion in tumor cell microenvironment on bystander effect of P450 prodrug therapy. *Cancer gene therapy* 13, 771-779.

Haut, L.H., Ratcliffe, S., Pinto, A.R., and Ertl, H. (2011). Effect of preexisting immunity to adenovirus on transgene product-specific genital T cell responses on vaccination of mice with a homologous vector. *The Journal of infectious diseases* 203, 1073-1081.

Haynes, N.M., van der Most, R.G., Lake, R.A., and Smyth, M.J. (2008). Immunogenic anti-cancer chemotherapy as an emerging concept. *Current opinion in immunology* 20, 545-557.

Heidelberger, C., Chaudhuri, N.K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., Schnitzer, R.J., Plevin, E., and Scheiner, J. (1957). Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature* 179, 663-666.

Henckaerts, E., and Linden, R.M. (2010). Adeno-associated virus: a key to the human genome? *Future virology* 5, 555-574.

Hermonat, P.L., and Muzyczka, N. (1984). Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 6466-6470.

Hitchings, G.H., and Elion, G.B. (1954). The chemistry and biochemistry of purine analogs. *Annals of the New York Academy of Sciences* 60, 195-199.

Hoos, A., and Britten, C. (2012). The immuno-oncology framework: Enabling a new era of cancer therapy. *Oncoimmunology* 1, 334-339.

Horwitz, E.M., Gordon, P.L., Koo, W.K., Marx, J.C., Neel, M.D., McNall, R.Y., Muul, L., and Hofmann, T. (2002). Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 8932-8937.

Horwitz, E.M., Prockop, D.J., Fitzpatrick, L.A., Koo, W.W., Gordon, P.L., Neel, M., Sussman, M., Orchard, P., Marx, J.C., Pyeritz, R.E., *et al.* (1999). Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature medicine* 5, 309-313.

Hou, F.X., Yang, H.F., Yu, T., and Chen, W. (2007). The immunosuppressive effects of 10mg/kg cyclophosphamide in Wistar rats. *Environmental toxicology and pharmacology* 24, 30-36.

Hu, L.L., Yu, B., and Yang, J. (2013). MDR1 polymorphisms associated with risk and survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma* 54, 1188-1193.

Hu, Y., Cheng, P., Xue, Y.X., and Liu, Y.H. (2012). Glioma cells promote the expression of vascular cell adhesion molecule-1 on bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a possible mechanism for their tropism toward gliomas. *Journal of molecular neuroscience* : MN 48, 127-135.

Huggins, C., and Hodges, C.V. (1972). Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *CA: a cancer journal for clinicians* 22, 232-240.

Iida, N., Dzutsev, A., Stewart, C.A., Smith, L., Bouladoux, N., Weingarten, R.A., Molina, D.A., Salcedo, R., Back, T., Cramer, S., *et al.* (2013). Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science* 342, 967-970.

Immonen, A., Vapalahti, M., Tyynela, K., Hurskainen, H., Sandmair, A., Vanninen, R., Langford, G., Murray, N., and Yla-Herttuala, S. (2004). AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 10, 967-972.

Jahnisch, H., Fussel, S., Kiessling, A., Wehner, R., Zastrow, S., Bachmann, M., Rieber, E.P., Wirth, M.P., and Schmitz, M. (2010). Dendritic cell-based immunotherapy for prostate cancer. *Clinical & developmental immunology* 2010, 517493.

Jiang, P.C., Xiong, W.P., Wang, G., Ma, C., Yao, W.Q., Kendell, S.F., Mehling, B.M., Yuan, X.H., and Wu, D.C. (2013). A clinical trial report of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in patients with spinal cord injury. *Experimental and therapeutic medicine* 6, 140-146.

Johnson, E.F., and Stout, C.D. (2013). Structural Diversity Of Eukaryotic Membrane Cytochromes P450. *The Journal of biological chemistry*.

Jounaidi, Y., Chen, C.S., Veal, G.J., and Waxman, D.J. (2006). Enhanced antitumor activity of P450 prodrug-based gene therapy using the low Km cyclophosphamide 4-hydroxylase P450 2B11. *Molecular cancer therapeutics* 5, 541-555.

Jounaidi, Y., Hecht, J.E., and Waxman, D.J. (1998). Retroviral transfer of human cytochrome P450 genes for oxazaphosphorine-based cancer gene therapy. *Cancer research* 58, 4391-4401.

Jung, Y., Kim, J.K., Shiozawa, Y., Wang, J., Mishra, A., Joseph, J., Berry, J.E., McGee, S., Lee, E., Sun, H., *et al.* (2013). Recruitment of mesenchymal stem cells into prostate tumours promotes metastasis. *Nature communications* 4, 1795.

Kameritsch, P., Khandoga, N., Pohl, U., and Pogoda, K. (2013). Gap junctional communication promotes apoptosis in a connexin-type-dependent manner. *Cell death & disease* 4, e584.

Kandouz, M., and Batist, G. (2010). Gap junctions and connexins as therapeutic targets in cancer. *Expert opinion on therapeutic targets* 14, 681-692.

Kar, R., Batra, N., Riquelme, M.A., and Jiang, J.X. (2012). Biological role of connexin intercellular channels and hemichannels. *Archives of biochemistry and biophysics* 524, 2-15.

Karle, P., Muller, P., Renz, R., Jesnowski, R., Saller, R., von Rombs, K., Nizze, H., Liebe, S., Gunzburg, W.H., Salmons, B., *et al.* (1998). Intratumoral injection of encapsulated cells producing an oxazaphosphorine activating cytochrome P450 for targeted chemotherapy. *Advances in experimental medicine and biology* 451, 97-106.

Katoh, M., Igarashi, M., Fukuda, H., Nakagama, H., and Katoh, M. (2013). Cancer genetics and genomics of human FOX family genes. *Cancer letters* 328, 198-206.

Katritsis, D.G., Sotiropoulou, P., Giazitzoglou, E., Karvouni, E., and Papamichail, M. (2007). Electrophysiological effects of intracoronary transplantation of autologous mesenchymal and endothelial progenitor cells. *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology* 9, 167-171.

Katritsis, D.G., Sotiropoulou, P.A., Karvouni, E., Karabinos, I., Korovesis, S., Perez, S.A., Vordidis, E.M., and Papamichail, M. (2005). Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions* 65, 321-329.

Kaye, S.B. (1998). New antimetabolites in cancer chemotherapy and their clinical impact. *British journal of cancer* 78 *Suppl* 3, 1-7.

Keedy, V., Wang, W., Schiller, J., Chada, S., Slovis, B., Coffee, K., Worrell, J., Thet, L.A., Johnson, D.H., and Carbone, D.P. (2008). Phase I study of adenovirus p53 administered by bronchoalveolar lavage in patients with bronchioloalveolar cell lung carcinoma: ECOG 6597. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26, 4166-4171.

Kepp, O., Menger, L., Vacchelli, E., Locher, C., Adjemian, S., Yamazaki, T., Martins, I., Sukkurwala, A.Q., Michaud, M., Senovilla, L., *et al.* (2013). Crosstalk between ER stress and immunogenic cell death. *Cytokine & growth factor reviews* 24, 311-318.

Kim, K.H., Dmitriev, I., O'Malley, J.P., Wang, M., Saddekni, S., You, Z., Preuss, M.A., Harris, R.D., Aurigemma, R., Siegal, G.P., *et al.* (2012). A phase I clinical trial of Ad5.SSTR/TK.RGD, a novel infectivity-enhanced bicistronic adenovirus, in patients with recurrent gynecologic cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18, 3440-3451.

Kim, N., and Cho, S.G. (2013). Clinical applications of mesenchymal stem cells. *The Korean journal of internal medicine* 28, 387-402.

Klatzmann, D., Cherin, P., Bensimon, G., Boyer, O., Coutellier, A., Charlotte, F., Boccaccio, C., Salzman, J.L., and Herson, S. (1998a). A phase I/II dose-escalation study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase "suicide" gene therapy for metastatic melanoma. Study Group on Gene Therapy of Metastatic Melanoma. *Human gene therapy* 9, 2585-2594.

Klatzmann, D., Valery, C.A., Bensimon, G., Marro, B., Boyer, O., Mokhtari, K., Diquet, B., Salzman, J.L., and Philippon, J. (1998b). A phase I/II study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase "suicide" gene therapy for recurrent glioblastoma. Study Group on Gene Therapy for Glioblastoma. *Human gene therapy* 9, 2595-2604.

Knox, R.J., Boland, M.P., Friedlos, F., Coles, B., Southan, C., and Roberts, J.J. (1988). The nitroreductase enzyme in Walker cells that activates 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB 1954) to 5-(aziridin-1-yl)-4-hydroxylamino-2-nitrobenzamide is a form of NAD(P)H dehydrogenase (quinone) (EC 1.6.99.2). *Biochemical pharmacology* 37, 4671-4677.

Knox, R.J., Friedlos, F., Sherwood, R.F., Melton, R.G., and Anlezark, G.M. (1992). The bioactivation of 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954)--II. A comparison of an *Escherichia coli* nitroreductase and Walker DT diaphorase. *Biochemical pharmacology* 44, 2297-2301.

Kosaka, H., Ichikawa, T., Kurozumi, K., Kambara, H., Inoue, S., Maruo, T., Nakamura, K., Hamada, H., and Date, I. (2012). Therapeutic effect of suicide gene-transferred mesenchymal stem cells in a rat model of glioma. *Cancer gene therapy* 19, 572-578.

Kotin, R.M. (2011). Large-scale recombinant adeno-associated virus production. *Human molecular genetics* 20, R2-6.

Koval, M. (2006). Pathways and control of connexin oligomerization. *Trends in cell biology* 16, 159-166.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., and Zitvogel, L. (2013). Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annual review of immunology* 31, 51-72.

Kroger, J.C., Benz, S., Hoffmeyer, A., Bago, Z., Bergmeister, H., Gunzburg, W.H., Karle, P., Kloppel, G., Losert, U., Muller, P., *et al.* (2003). Intra-arterial instillation of microencapsulated, Ifosfamide-activating cells in the pig pancreas for chemotherapeutic targeting. *Pancreatology* 3, 55-63.

Krumbhaar, E.B., and Krumbhaar, H.D. (1919). The Blood and Bone Marrow in Yellow Cross Gas (Mustard Gas) Poisoning: Changes produced in the Bone Marrow of Fatal Cases. *The Journal of medical research* 40, 497-508 493.

Kudo, M. (2011). Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma: bench to bedside. *Dig Dis* 29, 273-277.

Kudo, M. (2012). Targeted therapy for liver cancer: updated review in 2012. *Current cancer drug targets* 12, 1062-1072.

Kumar, M., Nagpal, R., Hemalatha, R., Verma, V., Kumar, A., Singh, S., Marotta, F., Jain, S., and Yadav, H. (2012). Targeted cancer therapies: the future of cancer treatment. *Acta bio-medica : Atenei Parmensis* 83, 220-233.

Kuriyama, S., Tsujinoue, H., and Yoshiji, H. (2004). Immune response to suicide gene therapy. *Methods in molecular medicine* 90, 353-369.

Kuroda, R., Ishida, K., Matsumoto, T., Akisue, T., Fujioka, H., Mizuno, K., Ohgushi, H., Wakitani, S., and Kurosaka, M. (2007). Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 15, 226-231.

Kwon, M.C., and Berns, A. (2013). Mouse models for lung cancer. *Molecular oncology* 7, 165-177.

Laizure, S.C., and Parker, R.B. (2010). A comparison of the metabolism of clopidogrel and prasugrel. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 6, 1417-1424.

Lang, F.F., Bruner, J.M., Fuller, G.N., Aldape, K., Prados, M.D., Chang, S., Berger, M.S., McDermott, M.W., Kunwar, S.M., Junck, L.R., *et al.* (2003). Phase I trial of adenovirus-mediated p53 gene therapy for recurrent glioma: biological and clinical results. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 21, 2508-2518.

Lazennec, G. (2011). [Mesenchymal stem cells: weapons or dangers for cancer treatment?]. *Medecine sciences : M/S* 27, 285-288.

Le Blanc, K., Gotherstrom, C., Ringden, O., Hassan, M., McMahon, R., Horwitz, E., Anneren, G., Axelsson, O., Nunn, J., Ewald, U., *et al.* (2005). Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. *Transplantation* 79, 1607-1614.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.

Lescaille, G., Pitoiset, F., Macedo, R., Baillou, C., Huret, C., Klatzmann, D., Tartour, E., Lemoine, F.M., and Bellier, B. (2013). Efficacy of DNA vaccines forming e7 recombinant retroviral virus-like particles for the treatment of human papillomavirus-induced cancers. *Human gene therapy* 24, 533-544.

Li, D., Zhang, Y., Xie, Y., Xiang, J., Zhu, Y., and Yang, J. (2013). Enhanced tumor suppression by adenoviral PTEN gene therapy combined with cisplatin chemotherapy in small-cell lung cancer. *Cancer gene therapy* 20, 251-259.

Li, S., Gu, C., Gao, Y., Amano, S., Koizumi, S., Tokuyama, T., and Namba, H. (2012). Bystander effect in glioma suicide gene therapy using bone marrow stromal cells. *Stem cell research* 9, 270-276.

Linden, R.M., Ward, P., Giraud, C., Winocour, E., and Berns, K.I. (1996). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *93*, 11288-11294.

Liu, S.G., Qin, X.G., Zhao, B.S., Qi, B., Yao, W.J., Wang, T.Y., Li, H.C., and Wu, X.N. (2013). Differential expression of miRNAs in esophageal cancer tissue. *Oncology letters* *5*, 1639-1642.

Loboz, K.K., Gross, A.S., Williams, K.M., Liauw, W.S., Day, R.O., Bliedernicht, J.K., Zanger, U.M., and McLachlan, A.J. (2006). Cytochrome P450 2B6 activity as measured by bupropion hydroxylation: effect of induction by rifampin and ethnicity. *Clinical pharmacology and therapeutics* *80*, 75-84.

Lohr, M., Muller, P., Karle, P., Stange, J., Mitzner, S., Jesnowski, R., Nizze, H., Nebe, B., Liebe, S., Salmons, B., *et al.* (1998). Targeted chemotherapy by intratumour injection of encapsulated cells engineered to produce CYP2B1, an ifosfamide activating cytochrome P450. *Gene therapy* *5*, 1070-1078.

Maatta, A.M., Samaranayake, H., Pikkarainen, J., Wirth, T., and Yla-Herttuala, S. (2009). Adenovirus mediated herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir gene therapy for resectable malignant glioma. *Current gene therapy* *9*, 356-367.

Mace, K., Bowman, E.D., Vautravers, P., Shields, P.G., Harris, C.C., and Pfeifer, A.M. (1998). Characterisation of xenobiotic-metabolising enzyme expression in human bronchial mucosa and peripheral lung tissues. *Eur J Cancer* *34*, 914-920.

Mackiewicz, J., and Mackiewicz, A. (2010). Gene-modified cellular vaccines: technologic aspects and clinical problems. *Transplantation proceedings* *42*, 3287-3292.

Magni, M., Shammah, S., Schiro, R., Mellado, W., Dalla-Favera, R., and Gianni, A.M. (1996). Induction of cyclophosphamide-resistance by aldehyde-dehydrogenase gene transfer. *Blood* *87*, 1097-1103.

Maier, P., von Kalle, C., and Laufs, S. (2010). Retroviral vectors for gene therapy. *Future microbiology* *5*, 1507-1523.

Mandel, K., Yang, Y., Schambach, A., Glage, S., Otte, A., and Hass, R. (2013). Mesenchymal stem cells (MSC) directly interact with breast cancer cells and promote tumor cell growth in vitro and in vivo. *Stem cells and development*.

Mansuy, D. (2011). Brief historical overview and recent progress on cytochromes P450: adaptation of aerobic organisms to their chemical environment and new mechanisms of prodrug bioactivation. *Annales pharmaceutiques francaises* *69*, 62-69.

Markou, A., Sourvinou, I., Vorkas, P.A., Yousef, G.M., and Lianidou, E. (2013). Clinical evaluation of microRNA expression profiling in non small cell lung cancer. *Lung Cancer* *81*, 388-396.

Martin, J., Helm, K., Ruegg, P., Varella-Garcia, M., Burnham, E., and Majka, S. (2008). Adult lung side population cells have mesenchymal stem cell potential. *Cytotherapy* *10*, 140-151.

Martins, I., Wang, Y., Michaud, M., Ma, Y., Sukkurwala, A.Q., Shen, S., Kepp, O., Metivier, D., Galluzzi, L., Perfettini, J.L., *et al.* (2013). Molecular mechanisms of ATP secretion during immunogenic cell death. *Cell death and differentiation*.

Mathews, M.S., Shih, E.C., Zamora, G., Sun, C.H., Cho, S.K., Kwon, Y.J., and Hirschberg, H. (2012). Glioma cell growth inhibition following photochemical internalization enhanced non-viral PTEN gene transfection. *Lasers in surgery and medicine* *44*, 746-754.

Matuskova, M., Hlubinova, K., Pastorakova, A., Hunakova, L., Altanerova, V., Altaner, C., and Kucerova, L. (2010). HSV-tk expressing mesenchymal stem cells exert bystander effect on human glioblastoma cells. *Cancer letters* *290*, 58-67.

McCarthy, H.O., Yakkundi, A., McErlane, V., Hughes, C.M., Keilty, G., Murray, M., Patterson, L.H., Hirst, D.G., McKeown, S.R., and Robson, T. (2003). Bioreductive GDEPT using cytochrome P450 3A4 in combination with AQ4N. *Cancer gene therapy* *10*, 40-48.

McCarty, D.M. (2008). Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* *16*, 1648-1656.

McClure, C., Cole, K.L., Wulff, P., Klugmann, M., and Murray, A.J. (2011). Production and titering of recombinant adeno-associated viral vectors. *Journal of visualized experiments : JoVE*, e3348.

McErlane, V., Yakkundi, A., McCarthy, H.O., Hughes, C.M., Patterson, L.H., Hirst, D.G., Robson, T., and McKeown, S.R. (2005). A cytochrome P450 2B6 mediated gene therapy strategy to enhance the effects of radiation or cyclophosphamide when combined with the bioreductive drug AQ4N. *The journal of gene medicine* *7*, 851-859.

McGraw, J., and Waller, D. (2012). Cytochrome P450 variations in different ethnic populations. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* *8*, 371-382.

Mellott, A.J., Forrest, M.L., and Detamore, M.S. (2013). Physical non-viral gene delivery methods for tissue engineering. *Annals of biomedical engineering* *41*, 446-468.

Mendell, J.R., Rodino-Klapac, L., Sahenk, Z., Malik, V., Kaspar, B.K., Walker, C.M., and Clark, K.R. (2012). Gene therapy for muscular dystrophy: lessons learned and path forward. *Neuroscience letters* *527*, 90-99.

Mesnil, M. (2004). [Gap junctions and cancer: implications and perspectives]. *Medecine sciences : M/S* *20*, 197-206.

Mesnil, M., Piccoli, C., Tiraby, G., Willecke, K., and Yamasaki, H. (1996). Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *93*, 1831-1835.

Meuwissen, R., and Berns, A. (2005). Mouse models for human lung cancer. *Genes & development* *19*, 643-664.

Michael, N.P., Brehm, J.K., Anlezark, G.M., and Minton, N.P. (1994). Physical characterisation of the *Escherichia coli* B gene encoding nitroreductase and its over-expression in *Escherichia coli* K12. *FEMS microbiology letters* *124*, 195-202.

Mimura, M., Baba, T., Yamazaki, H., Ohmori, S., Inui, Y., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., and Shimada, T. (1993). Characterization of cytochrome P-450 2B6 in human liver microsomes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* *21*, 1048-1056.

Mingozzi, F., Anguela, X.M., Pavani, G., Chen, Y., Davidson, R.J., Hui, D.J., Yazicioglu, M., Elkouby, L., Hinderer, C.J., Faella, A., *et al.* (2013). Overcoming preexisting humoral immunity to AAV using capsid decoys. *Science translational medicine* *5*, 194ra192.

Misumi, M., Suzuki, T., Moriuchi, S., Glorioso, J.C., and Bessho, M. (2003). In vitro thymidine kinase/ganciclovir-based suicide gene therapy using replication defective herpes simplex virus-1 against leukemic B-cell malignancies (MCL, HCL, B-CLL). *Leukemia research* *27*, 695-699.

Montini, E., Cesana, D., Schmidt, M., Sanvito, F., Bartholomae, C.C., Ranzani, M., Benedicenti, F., Sergi, L.S., Ambrosi, A., Ponzoni, M., *et al.* (2009). The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy. *The Journal of clinical investigation* *119*, 964-975.

Moolten, F.L. (1986). Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer research* *46*, 5276-5281.

Moskalenko, M., Chen, L., van Roey, M., Donahue, B.A., Snyder, R.O., McArthur, J.G., and Patel, S.D. (2000). Epitope mapping of human anti-adenovirus type 2 neutralizing antibodies: implications for gene therapy and virus structure. *Journal of virology* *74*, 1761-1766.

Muller, P., Jesnowski, R., Karle, P., Renz, R., Saller, R., Stein, H., Puschel, K., von Rombs, K., Nizze, H., Liebe, S., *et al.* (1999). Injection of encapsulated cells producing an ifosfamide-activating cytochrome P450 for targeted chemotherapy to pancreatic tumors. *Annals of the New York Academy of Sciences* *880*, 337-351.

Muller, P.A., and Vousden, K.H. (2013). p53 mutations in cancer. *Nature cell biology* *15*, 2-8.

Mullins, G.M., and Colvin, M. (1975). Intensive cyclophosphamide (NSC-26271) therapy for solid tumors. *Cancer chemotherapy reports Part 1* *59*, 411-419.

Murayama, N., Minoshima, M., Shimizu, M., Guengerich, F.P., and Yamazaki, H. (2007). Involvement of human cytochrome P450 2B6 in the omega- and 4-hydroxylation of the anesthetic agent propofol. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 37, 717-724.

Nakajima, M., Komagata, S., Fujiki, Y., Kanada, Y., Ebi, H., Itoh, K., Mukai, H., Yokoi, T., and Minami, H. (2007). Genetic polymorphisms of CYP2B6 affect the pharmacokinetics/pharmacodynamics of cyclophosphamide in Japanese cancer patients. *Pharmacogenetics and genomics* 17, 431-445.

Nasu, Y., Saika, T., Ebara, S., Kusaka, N., Kaku, H., Abarzua, F., Manabe, D., Thompson, T.C., and Kumon, H. (2007). Suicide gene therapy with adenoviral delivery of HSV-tK gene for patients with local recurrence of prostate cancer after hormonal therapy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 15, 834-840.

Nelson, D.R. (2006). Cytochrome P450 nomenclature, 2004. *Methods Mol Biol* 320, 1-10.

Nelson, D.R. (2009). The cytochrome p450 homepage. *Human genomics* 4, 59-65.

Nelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D.J., Guengerich, F.P., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Gonzalez, F.J., Coon, M.J., Gunsalus, I.C., Gotoh, O., *et al.* (1993). The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA and cell biology* 12, 1-51.

Nemunaitis, J., Cunningham, C., Senzer, N., Kuhn, J., Cramm, J., Litz, C., Cavagnolo, R., Cahill, A., Clairmont, C., and Sznol, M. (2003). Pilot trial of genetically modified, attenuated Salmonella expressing the E. coli cytosine deaminase gene in refractory cancer patients. *Cancer gene therapy* 10, 737-744.

Nguyen, T.A., Tychopoulos, M., Bichat, F., Zimmermann, C., Flinois, J.P., Diry, M., Ahlberg, E., Delaforge, M., Corcos, L., Beaune, P., *et al.* (2008). Improvement of cyclophosphamide activation by CYP2B6 mutants: from in silico to ex vivo. *Molecular pharmacology* 73, 1122-1133.

Niitsu, Y., Takahashi, Y., Ban, N., Takayama, T., Saito, T., Katahira, T., Umetsu, Y., Nakajima, T., Ohi, M., Kuga, T., *et al.* (1998). A proof of glutathione S-transferase-pi-related multidrug resistance by transfer of antisense gene to cancer cells and sense gene to bone marrow stem cell. *Chemico-biological interactions* 111-112, 325-332.

Nizard, M., Sandoval, F., Badoual, C., Pere, H., Terme, M., Hans, S., Benhamouda, N., Granier, C., Brasnu, D., and Tartour, E. (2013). Immunotherapy of HPV-associated head and neck cancer: Critical parameters. *Oncoimmunology* 2, e24534.

Ogier-Denis, E., Fasseu, M., Vandewalle, A., and Laburthe, M. (2007). [MicroRNAs and intestinal pathophysiology]. *Medecine sciences : M/S* 23, 509-514.

Pallante, P., Visone, R., Croce, C.M., and Fusco, A. (2010). Deregulation of microRNA expression in follicular-cell-derived human thyroid carcinomas. *Endocrine-related cancer* 17, F91-104.

Palmer, D.H., Mautner, V., Mirza, D., Oliff, S., Gerritsen, W., van der Sijp, J.R., Hubscher, S., Reynolds, G., Bonney, S., Rajaratnam, R., *et al.* (2004). Virus-directed enzyme prodrug therapy: intratumoral administration of a replication-deficient adenovirus encoding nitroreductase to patients with resectable liver cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 22, 1546-1552.

Pandha, H.S., Cook, D., Greenhalgh, R., and Dalglish, A. (2005). Immunotherapy of murine prostate cancer using whole tumour cells killed *ex vivo* by cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide-gene therapy. *BJU international* 95, 1336-1343.

Pandha, H.S., Martin, L.A., Rigg, A., Hurst, H.C., Stamp, G.W., Sikora, K., and Lemoine, N.R. (1999). Genetic prodrug activation therapy for breast cancer: A phase I clinical trial of erbB-2-directed suicide gene expression. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 17, 2180-2189.

Park, S.A., Ryu, C.H., Kim, S.M., Lim, J.Y., Park, S.I., Jeong, C.H., Jun, J.A., Oh, J.H., Park, S.H., Oh, W., *et al.* (2011). CXCR4-transfected human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells exhibit enhanced migratory capacity toward gliomas. *International journal of oncology* 38, 97-103.

Patel, P., Young, J.G., Mautner, V., Ashdown, D., Bonney, S., Pineda, R.G., Collins, S.I., Searle, P.F., Hull, D., Peers, E., *et al.* (2009). A phase I/II clinical trial in localized prostate cancer of an adenovirus expressing nitroreductase with CB1954 [correction of CB1984]. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 17, 1292-1299.

Patterson, L.H., and McKeown, S.R. (2000). AQ4N: a new approach to hypoxia-activated cancer chemotherapy. *British journal of cancer* 83, 1589-1593.

Peng, Z. (2005). Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Human gene therapy* 16, 1016-1027.

Pereira, D.J., McCarty, D.M., and Muzyczka, N. (1997). The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection. *Journal of virology* 71, 1079-1088.

Piao, Y., Liang, J., Holmes, L., Henry, V., Sulman, E., and de Groot, J.F. (2013). Acquired Resistance to Anti-VEGF Therapy in Glioblastoma Is Associated with a Mesenchymal Transition. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19, 4392-4403.

Picanco-Castro, V., de Sousa Russo-Carbolante, E.M., and Tadeu Covas, D. (2012). Advances in lentiviral vectors: a patent review. *Recent patents on DNA & gene sequences* 6, 82-90.

Pilati, P., Nitti, D., and Mocellin, S. (2012). Cancer resistance to type II topoisomerase inhibitors. *Current medicinal chemistry* 19, 3900-3906.

Pittenger, M.F., and Martin, B.J. (2004). Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circulation research* 95, 9-20.

Pitts, J.D. (1994). Cancer gene therapy: a bystander effect using the gap junctional pathway. *Molecular carcinogenesis* 11, 127-130.

Plate, J. (2011). Clinical trials of vaccines for immunotherapy in pancreatic cancer. *Expert review of vaccines* 10, 825-836.

Pointis, G., Fiorini, C., Gilleron, J., Carette, D., and Segretain, D. (2007). Connexins as precocious markers and molecular targets for chemical and pharmacological agents in carcinogenesis. *Current medicinal chemistry* 14, 2288-2303.

Porter, D.J., and Austin, E.A. (1993). Cytosine deaminase. The roles of divalent metal ions in catalysis. *The Journal of biological chemistry* 268, 24005-24011.

Prados, M.D., McDermott, M., Chang, S.M., Wilson, C.B., Fick, J., Culver, K.W., Van Gilder, J., Keles, G.E., Spence, A., and Berger, M. (2003). Treatment of progressive or recurrent glioblastoma multiforme in adults with herpes simplex virus thymidine kinase gene vector-producer cells followed by intravenous ganciclovir administration: a phase I/II multi-institutional trial. *Journal of neuro-oncology* 65, 269-278.

Preuss, E., Muik, A., Weber, K., Otte, J., von Laer, D., and Fehse, B. (2011). Cancer suicide gene therapy with TK.007: superior killing efficiency and bystander effect. *J Mol Med (Berl)* 89, 1113-1124.

Preuss, E., Treschow, A., Newrzela, S., Brucher, D., Weber, K., Felldin, U., Alici, E., Gahrton, G., von Laer, D., Dilber, M.S., *et al.* (2010). TK.007: A novel, codon-optimized HSVtk(A168H) mutant for suicide gene therapy. *Human gene therapy* 21, 929-941.

Purmonen, T.T. (2011). Cost-effectiveness of sunitinib in metastatic renal cell carcinoma. *Expert review of pharmacoeconomics & outcomes research* 11, 383-393.

Rainov, N.G. (2000). A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme. *Human gene therapy* 11, 2389-2401.

Raunio, H., Hakkola, J., Hukkanen, J., Lassila, A., Paivarinta, K., Pelkonen, O., Anttila, S., Piipari, R., Boobis, A., and Edwards, R.J. (1999). Expression of xenobiotic-metabolizing CYPs in human pulmonary tissue. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* 51, 412-417.

Rebucci, M., and Michiels, C. (2013). Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochemical pharmacology* 85, 1219-1226.

Rendic, S. (2002). Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug metabolism reviews* 34, 83-448.

Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.

Roberts, J.J., Friedlos, F., and Knox, R.J. (1986). CB 1954 (2,4-dinitro-5-aziridinyl benzamide) becomes a DNA interstrand crosslinking agent in Walker tumour cells. *Biochemical and biophysical research communications* 140, 1073-1078.

Robertson, S.M., Maldarelli, F., Natarajan, V., Formentini, E., Alfaro, R.M., and Penzak, S.R. (2008). Efavirenz induces CYP2B6-mediated hydroxylation of bupropion in healthy subjects. *J Acquir Immune Defic Syndr* 49, 513-519.

Rosenberg, S.A., Aebersold, P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan, R.A., Moen, R., Karson, E.M., Lotze, M.T., Yang, J.C., Topalian, S.L., *et al.* (1990). Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *The New England journal of medicine* 323, 570-578.

Roth, J.A., Nguyen, D., Lawrence, D.D., Kemp, B.L., Carrasco, C.H., Ferson, D.Z., Hong, W.K., Komaki, R., Lee, J.J., Nesbitt, J.C., *et al.* (1996). Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nature medicine* 2, 985-991.

Ruuskanen, O., Meurman, O., and Sarkkinen, H. (1985). Adenoviral diseases in children: a study of 105 hospital cases. *Pediatrics* 76, 79-83.

Sakuma, T., Barry, M.A., and Ikeda, Y. (2012). Lentiviral vectors: basic to translational. *The Biochemical journal* 443, 603-618.

Sakurai, F., Katayama, K., and Mizuguchi, H. (2011). MicroRNA-regulated transgene expression systems for gene therapy and virotherapy. *Front Biosci (Landmark Ed)* 16, 2389-2401.

Salama, P., Phillips, M., Grieu, F., Morris, M., Zeps, N., Joseph, D., Platell, C., and Iacopetta, B. (2009). Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27, 186-192.

Salmons, B., Lohr, M., and Gunzburg, W.H. (2003). Treatment of inoperable pancreatic carcinoma using a cell-based local chemotherapy: results of a phase I/II clinical trial. *Journal of gastroenterology* 38 *Suppl* 15, 78-84.

Sambrook, J., Westphal, H., Srinivasan, P.R., and Dulbecco, R. (1968). The integrated state of viral DNA in SV40-transformed cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 60, 1288-1295.

Sandoval, F., Terme, M., Nizard, M., Badoual, C., Bureau, M.F., Freyburger, L., Clement, O., Marcheteau, E., Gey, A., Fraisse, G., *et al.* (2013). Mucosal imprinting of vaccine-induced CD8(+) T cells is crucial to inhibit the growth of mucosal tumors. *Science translational medicine* 5, 172ra120.

Sangro, B., Mazzolini, G., Ruiz, M., Ruiz, J., Quiroga, J., Herrero, I., Qian, C., Benito, A., Larrache, J., Olague, C., *et al.* (2010). A phase I clinical trial of thymidine kinase-based gene therapy in advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer gene therapy* *17*, 837-843.

Sarkis, C., Philippe, S., Mallet, J., and Serguera, C. (2008). Non-integrating lentiviral vectors. *Current gene therapy* *8*, 430-437.

Schambach, A., Zychlinski, D., Ehrnstroem, B., and Baum, C. (2013). Biosafety features of lentiviral vectors. *Human gene therapy* *24*, 132-142.

Schmitt, F., Remy, S., Dariel, A., Flageul, M., Pichard, V., Boni, S., Usal, C., Myara, A., Laplanche, S., Anegon, I., *et al.* (2010). Lentiviral vectors that express UGT1A1 in liver and contain miR-142 target sequences normalize hyperbilirubinemia in Gunn rats. *Gastroenterology* *139*, 999-1007, 1007 e1001-1002.

Schwarz, D., Pirrwitz, J., Meyer, H.W., Coon, M.J., and Ruckpaul, K. (1990). Membrane topology of microsomal cytochrome P-450: saturation transfer EPR and freeze-fracture electron microscopy studies. *Biochemical and biophysical research communications* *171*, 175-181.

Schwarzenberger, P., Byrne, P., Gaumer, R., Norton, J., Harrison, L., Marrogi, A., and Kolls, J.K. (2011). Treatment of mesothelioma with gene-modified PA1STK cells and ganciclovir: a phase I study. *Cancer gene therapy* *18*, 906-912.

Scott, E.E., He, Y.A., Wester, M.R., White, M.A., Chin, C.C., Halpert, J.R., Johnson, E.F., and Stout, C.D. (2003). An open conformation of mammalian cytochrome P450 2B4 at 1.6-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 13196-13201.

Scully, R. (2000). Role of BRCA gene dysfunction in breast and ovarian cancer predisposition. *Breast cancer research : BCR* *2*, 324-330.

Segura, M.M., Alba, R., Bosch, A., and Chillon, M. (2008). Advances in helper-dependent adenoviral vector research. *Current gene therapy* *8*, 222-235.

Senovilla, L., Vacchelli, E., Garcia, P., Eggermont, A., Fridman, W.H., Galon, J., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2013). Trial watch: DNA vaccines for cancer therapy. *Oncoimmunology* *2*, e23803.

Senzer, N., Nemunaitis, J., Nemunaitis, D., Bedell, C., Edelman, G., Barve, M., Nunan, R., Pirolo, K.F., Rait, A., and Chang, E.H. (2013). Phase I Study of a Systemically Delivered p53 Nanoparticle in Advanced Solid Tumors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* *21*, 1096-1103.

Sevin, C., Benraiss, A., Van Dam, D., Bonnin, D., Nagels, G., Verot, L., Laurendeau, I., Vidaud, M., Gieselmann, V., Vanier, M., *et al.* (2006). Intracerebral adeno-associated virus-mediated gene transfer in rapidly progressive forms of metachromatic leukodystrophy. *Human molecular genetics* *15*, 53-64.

Shand, N., Weber, F., Mariani, L., Bernstein, M., Gianella-Borradori, A., Long, Z., Sorensen, A.G., and Barbier, N. (1999). A phase 1-2 clinical trial of gene therapy for recurrent glioblastoma multiforme by tumor transduction with the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir. GLI328 European-Canadian Study Group. *Human gene therapy* 10, 2325-2335.

Shimada, H., Matsubara, H., Shiratori, T., Shimizu, T., Miyazaki, S., Okazumi, S., Nabeya, Y., Shuto, K., Hayashi, H., Tanizawa, T., *et al.* (2006). Phase I/II adenoviral p53 gene therapy for chemoradiation resistant advanced esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer science* 97, 554-561.

Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y., and Guengerich, F.P. (1994). Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 270, 414-423.

Shiraki, H., and Guengerich, F.P. (1984). Turnover of membrane proteins: kinetics of induction and degradation of seven forms of rat liver microsomal cytochrome P-450, NADPH-cytochrome P-450 reductase, and epoxide hydrolase. *Archives of biochemistry and biophysics* 235, 86-96.

Shurin, M.R., Gregory, M., Morris, J.C., and Malyguine, A.M. (2010). Genetically modified dendritic cells in cancer immunotherapy: a better tomorrow? *Expert opinion on biological therapy* 10, 1539-1553.

Silva, A.C., Peixoto, C., Lucas, T., Koppers, C., Cruz, P.E., Alves, P.M., and Kochanek, S. (2010). Adenovirus vector production and purification. *Current gene therapy* 10, 437-455.

Singh, S., Cunningham, C., Buchanan, A., Jolly, D.J., and Nemunaitis, J. (2001). Toxicity assessment of intratumoral injection of the herpes simplex type I thymidine kinase gene delivered by retrovirus in patients with refractory cancer. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 4, 157-160.

Smutny, T., Mani, S., and Pavek, P. (2013). Post-translational and Post-transcriptional Modifications of Pregnane X Receptor (PXR) in Regulation of the Cytochrome P450 Superfamily. *Current drug metabolism* 14, 1059-1069.

Sohl, G., and Willecke, K. (2003). An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell communication & adhesion* 10, 173-180.

Solly, S.K., Trajcevski, S., Frisen, C., Holzer, G.W., Nelson, E., Clerc, B., Abordo-Adesida, E., Castro, M., Lowenstein, P., and Klatzmann, D. (2003). Replicative retroviral vectors for cancer gene therapy. *Cancer gene therapy* 10, 30-39.

Song, C., and Li, G. (2011). CXCR4 and matrix metalloproteinase-2 are involved in mesenchymal stromal cell homing and engraftment to tumors. *Cytotherapy* 13, 549-561.

Song, J.H., and Meltzer, S.J. (2012). MicroRNAs in pathogenesis, diagnosis, and treatment of gastroesophageal cancers. *Gastroenterology* 143, 35-47 e32.

Sterman, D.H., Recio, A., Vachani, A., Sun, J., Cheung, L., DeLong, P., Amin, K.M., Litzky, L.A., Wilson, J.M., Kaiser, L.R., *et al.* (2005). Long-term follow-up of patients with malignant pleural mesothelioma receiving high-dose adenovirus herpes simplex thymidine kinase/ganciclovir suicide gene therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11, 7444-7453.

Sterman, D.H., Treat, J., Litzky, L.A., Amin, K.M., Coonrod, L., Molnar-Kimber, K., Recio, A., Knox, L., Wilson, J.M., Albelda, S.M., *et al.* (1998). Adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy in patients with localized malignancy: results of a phase I clinical trial in malignant mesothelioma. *Human gene therapy* 9, 1083-1092.

Stolberg, S.G. (1999). The biotech death of Jesse Gelsinger. *The New York times magazine*, 136-140, 149-150.

Stresser, D.M., and Kupfer, D. (1999). Monospecific antipeptide antibody to cytochrome P-450 2B6. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 27, 517-525.

Suzuki, T., Sakurai, F., Nakamura, S., Kouyama, E., Kawabata, K., Kondoh, M., Yagi, K., and Mizuguchi, H. (2008). miR-122a-regulated expression of a suicide gene prevents hepatotoxicity without altering antitumor effects in suicide gene therapy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16, 1719-1726.

Tang, Y., Cummins, J., Huard, J., and Wang, B. (2010). AAV-directed muscular dystrophy gene therapy. *Expert opinion on biological therapy* 10, 395-408.

Tang, Y., Liu, D., Zhang, L., Ingvarsson, S., and Chen, H. (2011). Quantitative analysis of miRNA expression in seven human foetal and adult organs. *PloS one* 6, e28730.

Tatum, E.L., and Lederberg, J. (1947). Gene Recombination in the Bacterium *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 53, 673-684.

Thum, T., and Borlak, J. (2004). Mechanistic role of cytochrome P450 monooxygenases in oxidized low-density lipoprotein-induced vascular injury: therapy through LOX-1 receptor antagonism? *Circulation research* 94, e1-13.

Tiscornia, G., Singer, O., and Verma, I.M. (2006). Production and purification of lentiviral vectors. *Nature protocols* 1, 241-245.

Tolcher, A.W., Hao, D., de Bono, J., Miller, A., Patnaik, A., Hammond, L.A., Smetzer, L., Van Wart Hood, J., Merritt, J., Rowinsky, E.K., *et al.* (2006). Phase I, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of intravenously administered Ad5CMV-p53, an adenoviral vector containing the wild-type p53 gene, in patients with advanced cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24, 2052-2058.

Totonchy, J.E., Osborn, J.M., Botto, S., Clepper, L., and Moses, A.V. (2013). Aberrant Proliferation in CXCR7+ Endothelial Cells via Degradation of the Retinoblastoma Protein. *PLoS one* 8, e69828.

Traore, F., Coze, C., Atteby, J.J., Andre, N., Moreira, C., Doumbe, P., Ravelomanana, N., Ye, D., Patte, C., Raquin, M.A., *et al.* (2011). Cyclophosphamide monotherapy in children with Burkitt lymphoma: a study from the French-African Pediatric Oncology Group (GFAOP). *Pediatric blood & cancer* 56, 70-76.

Trask, T.W., Trask, R.P., Aguilar-Cordova, E., Shine, H.D., Wyde, P.R., Goodman, J.C., Hamilton, W.J., Rojas-Martinez, A., Chen, S.H., Woo, S.L., *et al.* (2000). Phase I study of adenoviral delivery of the HSV-tk gene and ganciclovir administration in patients with current malignant brain tumors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 1, 195-203.

Tychopoulos, M., Corcos, L., Genne, P., Beaune, P., and de Waziers, I. (2005). A virus-directed enzyme prodrug therapy (VDEPT) strategy for lung cancer using a CYP2B6/NADPH-cytochrome P450 reductase fusion protein. *Cancer gene therapy* 12, 497-508.

Vacchelli, E., Galluzzi, L., Fridman, W.H., Galon, J., Sautes-Fridman, C., Tartour, E., and Kroemer, G. (2012). Trial watch: Chemotherapy with immunogenic cell death inducers. *Oncoimmunology* 1, 179-188.

Vacchelli, E., Senovilla, L., Eggermont, A., Fridman, W.H., Galon, J., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2013). Trial watch: Chemotherapy with immunogenic cell death inducers. *Oncoimmunology* 2, e23510.

van Haperen, V.W., Veerman, G., Vermorken, J.B., Pinedo, H.M., and Peters, G. (1996). Regulation of phosphorylation of deoxycytidine and 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine); effects of cytidine 5'-triphosphate and uridine 5'-triphosphate in relation to chemosensitivity for 2',2'-difluorodeoxycytidine. *Biochemical pharmacology* 51, 911-918.

Vannucci, L., Lai, M., Chiuppesi, F., Ceccherini-Nelli, L., and Pistello, M. (2013). Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *The new microbiologica* 36, 1-22.

Ventura, A., Kirsch, D.G., McLaughlin, M.E., Tuveson, D.A., Grimm, J., Lintault, L., Newman, J., Reczek, E.E., Weissleder, R., and Jacks, T. (2007). Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* 445, 661-665.

Vernejoul, F., Ghenassia, L., Souque, A., Lulka, H., Drocourt, D., Cordelier, P., Pradayrol, L., Pyronnet, S., Buscail, L., and Tiraby, G. (2006). Gene therapy based on gemcitabine chemosensitization suppresses pancreatic tumor growth. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 14, 758-767.

Viaud, S., Saccheri, F., Mignot, G., Yamazaki, T., Daillere, R., Hannani, D., Enot, D.P., Pfirschke, C., Engblom, C., Pittet, M.J., *et al.* (2013). The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science* 342, 971-976.

Voelcker, G., Wagner, T., Wientzek, C., and Hohorst, H.J. (1984). Pharmacokinetics of "activated" cyclophosphamide and therapeutic efficacies. *Cancer* 54, 1179-1186.

Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1992). p53 function and dysfunction. *Cell* 70, 523-526.

Vrancken Peeters, M.J., Perkins, A.L., and Kay, M.A. (1996). Method for multiple portal vein infusions in mice: quantitation of adenovirus-mediated hepatic gene transfer. *BioTechniques* 20, 278-285.

Wadell, G. (1984). Molecular epidemiology of human adenoviruses. *Current topics in microbiology and immunology* 110, 191-220.

Wakitani, S., Imoto, K., Yamamoto, T., Saito, M., Murata, N., and Yoneda, M. (2002). Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 10, 199-206.

Wakitani, S., Mitsuoka, T., Nakamura, N., Toritsuka, Y., Nakamura, Y., and Horibe, S. (2004). Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports. *Cell transplantation* 13, 595-600.

Wakitani, S., Nawata, M., Tensho, K., Okabe, T., Machida, H., and Ohgushi, H. (2007). Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 1, 74-79.

Wang, W.J., Tai, C.K., Kasahara, N., and Chen, T.C. (2003). Highly efficient and tumor-restricted gene transfer to malignant gliomas by replication-competent retroviral vectors. *Human gene therapy* 14, 117-127.

Wanisch, K., and Yanez-Munoz, R.J. (2009). Integration-deficient lentiviral vectors: a slow coming of age. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 17, 1316-1332.

Warnock, J.N., Daigre, C., and Al-Rubeai, M. (2011). Introduction to viral vectors. *Methods Mol Biol* 737, 1-25.

Weber, G.F., and Waxman, D.J. (1993). Activation of the anti-cancer drug ifosphamide by rat liver microsomal P450 enzymes. *Biochemical pharmacology* 45, 1685-1694.

Wei, M.X., Tamiya, T., Chase, M., Boviatsis, E.J., Chang, T.K., Kowall, N.W., Hochberg, F.H., Waxman, D.J., Breakefield, X.O., and Chiocca, E.A. (1994). Experimental tumor therapy in mice using the cyclophosphamide-activating cytochrome P450 2B1 gene. *Human gene therapy* 5, 969-978.

Wei, M.X., Tamiya, T., Rhee, R.J., Breakefield, X.O., and Chiocca, E.A. (1995). Diffusible cytotoxic metabolites contribute to the in vitro bystander effect associated with the

cyclophosphamide/cytochrome P450 2B1 cancer gene therapy paradigm. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 1, 1171-1177.

West, H., Oxnard, G.R., and Doebele, R.C. (2013). Acquired resistance to targeted therapies in advanced non-small cell lung cancer. *American Society of Clinical Oncology educational book / ASCO American Society of Clinical Oncology Meeting 2013*, 272-278.

Westphal, M., Yla-Herttuala, S., Martin, J., Warnke, P., Menei, P., Eckland, D., Kinley, J., Kay, R., and Ram, Z. (2013). Adenovirus-mediated gene therapy with sitimagene ceradenovec followed by intravenous ganciclovir for patients with operable high-grade glioma (ASPECT): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The lancet oncology* 14, 823-833.

Wiley, J.C., Coy, E.L., Frampton, M.W., Torres, A., Apostolakos, M.J., Hoehn, G., Schuermann, W.H., Thilly, W.G., Olson, D.E., Hammersley, J.R., *et al.* (1997). Quantitative RT-PCR measurement of cytochromes p450 1A1, 1B1, and 2B7, microsomal epoxide hydrolase, and NADPH oxidoreductase expression in lung cells of smokers and nonsmokers. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 17, 114-124.

Wilson, J.M. (2005). Gendicine: the first commercial gene therapy product. *Human gene therapy* 16, 1014-1015.

Wirth, T., and Yla-Herttuala, S. (2013). History of gene therapy. *Gene*.

Wolf, J.K., Bodurka, D.C., Gano, J.B., Deavers, M., Ramondetta, L., Ramirez, P.T., Levenback, C., and Gershenson, D.M. (2004). A phase I study of Adp53 (INGN 201; ADVEXIN) for patients with platinum- and paclitaxel-resistant epithelial ovarian cancer. *Gynecologic oncology* 94, 442-448.

Wu, C., Lin, J., Hong, M., Choudhury, Y., Balani, P., Leung, D., Dang, L.H., Zhao, Y., Zeng, J., and Wang, S. (2009). Combinatorial control of suicide gene expression by tissue-specific promoter and microRNA regulation for cancer therapy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 17, 2058-2066.

Xiao, J., Zhang, G., Qiu, P., Liu, X., Wu, Y., Du, B., Li, J., Zhou, J., Li, J., and Tan, Y. (2013). Tanshinone IIA increases the bystander effect of herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy via enhanced gap junctional intercellular communication. *PloS one* 8, e67662.

Xie, H.J., Yasar, U., Lundgren, S., Griskevicius, L., Terelius, Y., Hassan, M., and Rane, A. (2003). Role of polymorphic human CYP2B6 in cyclophosphamide bioactivation. *The pharmacogenomics journal* 3, 53-61.

Xu, F., Li, S., Li, X.L., Guo, Y., Zou, B.Y., Xu, R., Liao, H., Zhao, H.Y., Zhang, Y., Guan, Z.Z., *et al.* (2009). Phase I and biodistribution study of recombinant adenovirus vector-mediated herpes simplex virus thymidine kinase gene and ganciclovir administration in patients with head and neck cancer and other malignant tumors. *Cancer gene therapy* 16, 723-730.

Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* *445*, 656-660.

Yakkundi, A., McErlane, V., Murray, M., McCarthy, H.O., Ward, C., Hughes, C.M., Patterson, L.H., Hirst, D.G., McKeown, S.R., and Robson, T. (2006). Tumor-selective drug activation: a GDEPT approach utilizing cytochrome P450 1A1 and AQ4N. *Cancer gene therapy* *13*, 598-605.

Yamada, A., Sasada, T., Noguchi, M., and Itoh, K. (2013). Next-generation peptide vaccines for advanced cancer. *Cancer science* *104*, 15-21.

Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., Stephens, R.M., Okamoto, A., Yokota, J., Tanaka, T., *et al.* (2006). Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer cell* *9*, 189-198.

Yang, J., Lam, D.H., Goh, S.S., Lee, E.X., Zhao, Y., Tay, F.C., Chen, C., Du, S., Balasundaram, G., Shahbazi, M., *et al.* (2012). Tumor tropism of intravenously injected human-induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells and their gene therapy application in a metastatic breast cancer model. *Stem Cells* *30*, 1021-1029.

Yang, Z., Zhang, F., Ma, W., Chen, B., Zhou, F., Xu, Z., Zhang, Y., Zhang, D., Zhu, T., Wang, L., *et al.* (2010). A novel approach to transplanting bone marrow stem cells to repair human myocardial infarction: delivery via a noninfarct-related artery. *Cardiovascular therapeutics* *28*, 380-385.

Yarborough, M., and Sharp, R.R. (2009). Public trust and research a decade later: what have we learned since Jesse Gelsinger's death? *Molecular genetics and metabolism* *97*, 4-5.

Yin, J.Q., Zhao, R.C., and Morris, K.V. (2008). Profiling microRNA expression with microarrays. *Trends in biotechnology* *26*, 70-76.

Yu, L.J., Matias, J., Scudiero, D.A., Hite, K.M., Monks, A., Sausville, E.A., and Waxman, D.J. (2001). P450 enzyme expression patterns in the NCI human tumor cell line panel. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* *29*, 304-312.

Zhang, J., Liu, Y., Liu, Z., Wang, X.M., Yin, D.T., Zheng, L.L., Zhang, D.Y., and Lu, X.B. (2013). Differential expression profiling and functional analysis of microRNAs through stage I-III papillary thyroid carcinoma. *International journal of medical sciences* *10*, 585-592.

Zheng, L., Xue, J., Jaffee, E.M., and Habtezion, A. (2013). Role of immune cells and immune-based therapies in pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterology* *144*, 1230-1240.

Zimonjic, D.B., and Popescu, N.C. (2012). Role of DLC1 tumor suppressor gene and MYC oncogene in pathogenesis of human hepatocellular carcinoma: potential prospects for combined targeted therapeutics (review). *International journal of oncology* *41*, 393-406.

Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., and Hedrick, M.H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell* 13, 4279-4295.

Zvaifler, N.J., Marinova-Mutafchieva, L., Adams, G., Edwards, C.J., Moss, J., Burger, J.A., and Maini, R.N. (2000). Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis research* 2, 477-488.

RÉSUMÉ

Les thérapies anticancéreuses ont connu ces dernières années un développement important ayant pour conséquence une amélioration dans la qualité de vie des patients. Cependant la survenue de résistances et la part significative de cancer sans traitement efficace nous oblige à envisager le développement de nouvelles stratégies anticancéreuses.

Nous avons développé une nouvelle technique basée sur le principe du gène suicide en utilisant le gène du cytochrome P450 2B6 associé au cyclophosphamide (CPA). Cette technique qui consiste au transfert d'un gène métabolisant une prodrogue anticancéreuse dans la tumeur permet une sensibilisation des tumeurs à cette prodrogue.

Le premier objectif de ce travail a consisté à améliorer le métabolisme de la prodrogue en construisant un gène muté du CYP2B6 en fusion avec la réductase, partenaire indispensable du CYP.

Dans un deuxième temps nous avons transféré le gène CYP2B6TM-RED dans des cellules tumorales qui sont devenues sensibles au CPA entraînant une éradication des tumeurs. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* sur des modèles de souris immunocompétentes. Nous avons, en plus de l'effet cytotoxique, mis en évidence un important effet *bystander* et le développement d'une immunité antitumorale spécifique. Ceci nous laisse penser que cette méthode peut permettre de protéger contre les récurrences et les métastases.

Les bons résultats obtenus dans le développement de cette nouvelle stratégie anticancéreuse, nous laissent espérer d'un futur passage en clinique. Pour cela de nouveaux modèles animaux devront être mis au point pour optimiser le transfert du transgène dans les tumeurs.

ABSTRACT

Anticancer therapies had, in recent years, an important development that results in an improvement in the quality of life of patients. However, the occurrence of resistance and the significant proportion of untreated cancer force us to consider the development of new anticancer strategies.

We have developed a new technique based on the principle of suicide gene using the gene of cytochrome P450 2B6 associated with cyclophosphamide (CPA). This technique involves the transfer of a gene metabolizing an anticancer prodrug within the tumor allowing tumors sensitization to this prodrug.

The first objective of this work was to improve the metabolism of the prodrug in building a mutated CYP2B6 fused with the reductase gene essential partner of CYP.

In a second step we transferred the CYP2B6TM-RED gene in tumor cells that have been significantly sensitized. These results were confirmed on *in vivo* models of immunocompetent mice. In addition to the cytotoxic effect, mice were able to develop a specific anti-tumor immunity. This suggests to us that this method can protect against recurrence and metastasis.

The good results obtained in the development of this new anticancer strategy, let us hope for a future transition into clinic. For this, new animal models will be developed to definitively validate the method.